[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580024164.7

[43] 公开日 2007 年 10 月 31 日

[11] 公开号 CN 101065400A

[22] 申请日 2005.5.17
[21] 申请号 200580024164.7
[30] 优先权
[32] 2004. 5.19 [33] US [31] 60/572,349
[86] 国际申请 PCT/US2005/017050 2005.5.17
[87] 国际公布 WO2005/116192 英 2005.12.8
[85] 进入国家阶段日期 2007.1.17
[71] 申请人 克里夫兰诊所基金会
地址 美国俄亥俄州
[72] 发明人 马克·S·佩恩
马修·凯德罗夫斯基

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司
代理人 余 朦 方 挺

权利要求书 3 页 说明书 31 页 序列表 9 页
附图 6 页

[54] 发明名称

用于治疗性应用的经遗传改变的细胞

[57] 摘要

分离的间充质干细胞、多潜能成体祖细胞或其它干细胞被遗传修饰以表达 CXCR4、SDF－1 或其变体中的至少一种。

1. 分离的干细胞，其被遗传修饰以表达 CXCR4、SDF-1 或其变体中的至少一种。

2. 如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其被遗传修饰以表达蛋白质或多肽，所述蛋白质或多肽具有对应于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 或其变体中的至少一种的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其被外源遗传物质遗传修饰，所述外源遗传物质包含对应于 CXCR4 基因、SDF-1 基因或其变体的至少一部分的核酸。

4. 如权利要求 3 所述的分离的干细胞，所述核酸对应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或其变体。

5. 如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其选自间充质干细胞或多潜能成体祖细胞。

6. 如权利要求 1 所述的分离的干细胞，其被遗传修饰以表达 CXCR4 和 SDF-1，或 CXCR4 和 SDF-1 的变体。

7. 被外源遗传物质转染的分离的干细胞，所述外源遗传物质包含对应于 CXCR4 基因、SDF-1 基因或其变体的至少一部分的核酸。

8. 如权利要求 7 所述的分离的干细胞，所述核酸对应于 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 或其变体。

9. 如权利要求 8 所述的分离的干细胞，其表达 CXCR4、SDF-1

或其变体中的至少一种。

10. 如权利要求 9 所述的分离的干细胞，其表达蛋白质，所述蛋白质具有对应于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 或其变体中的至少一种的氨基酸序列。

11. 如权利要求 7 所述的分离的干细胞，其选自间充质干细胞或多潜能成体祖细胞。

12. 治疗性应用，包括以干细胞向接受治疗的个体给药，所述干细胞被遗传修饰以表达 CXCR4、SDF-1 或其变体中的至少一种。

13. 如权利要求 12 所述的治疗性应用，所述干细胞表达蛋白质或多肽，所述蛋白质或多肽具有对应于 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 或其变体中的至少一种的氨基酸序列。

14. 如权利要求 12 所述的治疗性应用，被用于治疗心肌梗塞，通过使所述干细胞递送至梗塞心肌组织而以所述干细胞给药。

15. 如权利要求 14 所述的治疗性应用，所述干细胞包括间充质干细胞或多潜能成体祖细胞中的至少一种。

16. 如权利要求 15 所述的治疗性应用，所述干细胞通过选自直接注射、静脉输注和动脉输注的方法来给药。

17. 如权利要求 16 所述的治疗性应用，包括对所述接受治疗的个体进行动员剂给药，所述动员剂诱导其它干细胞从所述接受治疗的个体的组织动员至外周血。

18. 如权利要求 17 所述的治疗性应用，所述动员剂给药在所述干细胞给药之后。

19. 如权利要求 17 所述的治疗性应用，所述动员剂包括粒细胞集落刺激因子。

用于治疗性应用的经遗传改变的细胞

发明领域

本发明涉及经遗传修饰的细胞，尤其涉及经遗传修饰的细胞在治疗性应用中的用途。

发明背景

急性心肌梗塞(MI)在西方社会仍是致病和死亡的主要原因。最近的治疗进展普遍关注于在梗塞相关动脉内恢复顺行灌注，但其效果显示存在"上限"。Topol, E.J. *Lancet* 357, 1905-1914 (2001)。很大一部分急性心肌梗塞(MI)患者最终发展为充血性心力衰竭(CHF)，主要原因为左心室(LV)重塑，其过程包括心肌的变细、扩张、功能下降并最终导致死亡。Robbins, M.A.& O'Connell, J.B., pp. 3-13(Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998)。Pfeffer, J.M.,Pfeffer, M.A., Fletcher, P.J. & Braunwald, E. *Am. J. Physiol* 260, H1406-H1414 (1991)。Pfeffer, M.A. & Braunwald, E. *Circulation* 81, 1161-1 172 (1990)。

一种治疗心肌梗塞之后的这一过程的方法涉及细胞疗法。Penn, M.S. *et al. Prog. Cardiovasc. Dis.* 45,21-32 (2002)。细胞疗法重在使用不同的细胞类型，包括已分化的细胞，如骨骼成肌细胞、心肌细胞、平滑肌细胞以及成纤维细胞，或骨髓源性细胞。Koh, G.Y., Klug, M.G., Soonpaa, M.H. & Field, L.J. *J. Clin. Invest* 92, 1548-1554 (1993)。Taylor, D.A. *et al. Nat. Med.* 4, 929-933 (1998)。Jain, M. *et al. Circulation* 103, 1920-1927 (2001)。Li, R.K. *et al. Ann. Thorac. Surg.* 62, 654-660 (1996)。Etzion, S. *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 33, 1321-1330 (2001)。Li, R.K., Jia, Z.Q., Weisel, R.D., Merante, F. & Mickle, D.A. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 513-522 (1999)。Yoo, K.J. *et al. Yonsei Med. J.* 43,296-303 (2002)。Sakai, T. *et al. Ann. Thorac. Surg.* 68,2074-2080 (1999)。Sakai, T. *et al. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 118, 715-724 (1999)。Orlic, D. *et al. Nature*

410, 701-705 (2001)。Tomita, S. *et al. J Thorac. Cardiovasc. Surg.* 123, 1132-1140 (2002)。

日益增多的文献证明，干细胞被动员至心脏和分化为心肌细胞为自然发生的过程。Jackson, K.A. *et al. J. Clin. Invest* 107, 1395-1402 (2001)。Quaini, F. *et al. N. Engl. J Med.* 346, 5-15 (2002)。而这一过程发生的速率不足以令心肌梗塞后的左心室功能有实质性恢复。最近，研究已证明通过向血流中直接注入干细胞，或通过在心肌梗塞之前从骨髓中化学动员干细胞，有可能使受损心肌再生。这些研究证明干细胞能够在围梗塞期(peri-infarct period)归集(home)至梗塞区域，以及随后这些细胞能够分化为心肌细胞。Kocher, A.A. *et al. Nat. Med.* 7,430-436 (2001)。Orlic, D. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98, 10344-10349 (2001)。Peled, A. *et al. Blood* 95,3289-3296 (2000)。Yong, K. et al. *Br. J. Haematol.* 107,441-449 (1999)。至今，所有研究专注于干细胞在心肌梗塞后 48 小时内使心肌再生的能力。

发明概述

本发明涉及间充质干细胞(MSCs)、多潜能成体祖细胞(MAPCs)和/或其它能够分化为组织或器官系统(例如包括心肌细胞和血管在内的心脏结构)中特化或部分特化的细胞类型的干细胞。依据本发明，MSCs, MAPCs 和/或其它干细胞经遗传改变或修饰，以便过量表达趋化因子和/或趋化因子受体，其能够大大改善经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它(例如用于心肌再生的目的)干细胞的存活能力以及寿命，以及潜在地改善其中被引入经遗传修饰的干细胞的组织的存活能力。因治疗性应用和/或细胞疗法(例如在充血性心力衰竭和/或急性心肌梗塞中，使心肌组织再生、恢复心肌功能或保护心功能)而将经遗传修饰的干细胞引入哺乳动物个体时，过量表达的趋化因子和/或趋化因子受体能够减缓经遗传修饰的干细胞的凋亡。过量表达的趋化因子和/或趋化因子受体也可潜在地减缓以经遗传修饰的MSCs、MAPCs和/或其它(例如用于心肌再生的)干细胞治疗的哺乳动物个体的组织中的凋亡。

在本发明的一方面，干细胞可经遗传修饰而过量表达 CXC 趋化因

子受体 4(CXCR4)。过量表达 CXCR4 的干细胞可被直接注射进心肌组织或经静脉或动脉输注，以治疗近期心肌梗塞或充血性心力衰竭。由 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达 CXCR4 可潜在地提高心肌组织内 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的存活能力，以及促进 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞如造血干细胞归集至 SDF-1 和/或表达 SDF-1 的细胞。

依据本发明的另一方面，MSCs、MAPCs 和/或其它(例如用于心肌再生的)干细胞可经遗传修饰而过量表达 SDF-1。过量表达 SDF-1 的干细胞可被直接注射进心肌组织或经静脉或动脉输注，以治疗近期心肌梗塞或充血性心力衰竭。由干细胞表达的 SDF-1 可潜在地诱导外周血中的干细胞归集至梗塞的心肌。此外，SDF-1 的过量表达还能大大提高 MSCs、MAPCs 和/或其它(例如用于心肌再生的)干细胞以及类似于 MSCs 和/或 MAPCs 的其它细胞的存活能力。

在本发明的另一方面，MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可经遗传修饰同时过量表达 CXCR4 和 SDF-1。同时过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的干细胞可被直接注射进心肌组织或经静脉或动脉输注，以治疗近期心肌梗塞或充血性心力衰竭。由干细胞表达的 CXCR4 和 SDF-1 可潜在地诱导外周血中的干细胞归集至梗塞的心肌。此外，CXCR4 和 SDF-1 的过量表达还能够大大提高 MSCs、MAPCs 和/或其它用于心肌再生的干细胞以及类似于干细胞的其它细胞的存活能力。

附图简要说明

在参考附图阅读以下说明后，本发明所属领域的技术人员可清楚了解本发明的前述以及其它方面。

图 1 为解释使用本发明的经遗传修饰以过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的临床策略的示意框图。

图 2 为显示大鼠注入 MSCs 和经遗传修饰的 MSCs 3 天后，梗塞区域单位面积内 MSCs 和经遗传修饰以表达 CXCR4 的 MSCs 的数量的图。

图 3 为 western 印迹分析，显示经稳定转染以表达 CXCR4 或

SDF-1 的大鼠 MSCs 的 AKT 比未转染的 MSCs 的 AKT 易于磷酸化。

图 4A 为照片，显示注入对照 MSCs 和表达 SDF-1 或 CXCR4 的 MSCs 3 天后相应大鼠的梗塞区域的代表性切片。

图 4B 为比较注入 3 天后梗塞区域单位面积内对照 MSCs 的数量和经遗传修饰以表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSCs 的数量的图。

图 5 为心肌梗塞 4 天后以对照 MSCs 和表达 SDF-1 的 MSCs 治疗的大鼠的相应梗塞区域的照片。

图 6 显示心肌梗塞 14 天后，注入无机盐、心脏成纤维细胞、对照 MSCs、表达 SDF-1 的 MSCs 以及表达 CXCR4 的 MSCs 的大鼠的 LV 功能的改善状况。

详细说明

除非另有说明，此处用到的所有技术术语的含义与本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的含义相同。分子生物学术语的通用定义可以例如参见 Rieger *et al.*, Glossary of Genetics: Classical and Molecular(经典与分子遗传学词典), 5th edition, Springer-Verlag: New York, 1991; 以及 Lewin, Genes V(基因 V), Oxford University Press: New York, 1994。

此处描述的方法包括传统分子生物学技术在内。这些技术在本领域内已被广泛了解，其详细描述可参见方法学论著，如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual(分子克隆实验室手册), 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sarnbrook *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 以及 Current Protocols in Molecular Biology(现代分子生物学规程), ed. Ausubel *et al.*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (有定期更新)。核酸化学的合成方法的论述可参见如 Beaucage and Carmthers, Tetra. Letts. 22: 1859-1862, 1981，以及 Matteucci *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981。核酸的化学合成可由例如商品化的自动寡核苷酸合成仪来完成。免疫学方法(如抗原特异性抗体的制备、免疫沉淀和免疫印迹)的描述可参见如 Current Protocols in Immunology(现代免疫学规程), ed. Coligan *et al.*,

John Wiley & Sons, New York, 1991; 以及 Methods of Immunological Analysis(免疫学分析方法), ed. Masseyeff *et al.*, John Wiley & Sons, New York, 1992。常规的基因转移和基因治疗方法也适于在本发明中使用。例如参见，Gene Therapy: Principles and Applications(基因治疗：原理与应用), ed. T. Blackenstein, Springer Verlag, 1999; Gene Therapy Protocols (Methods in Molecular Medicine)(基因治疗规程(分子医学方法)), ed. P. D. Robbins, Humana Press, 1997; 以及 Retro-vectors for Human Gene Therapy(用于人类基因治疗的逆转录载体), ed. C. P. Hodgson, Springer Verlag, 1996。

本发明涉及间充质干细胞(MSCs)、多潜能成体祖细胞(MAPCs)和/或其它能够分化为组织或器官系统中特化或部分特化的细胞类型的(例如用于使包括心肌细胞和血管在内的心肌结构再生的)干细胞。MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞经过遗传改变或遗传修饰，以过量表达趋化因子和/或趋化因子受体，这些趋化因子和/或趋化因子受体能大大改善这些经遗传修饰的干细胞的存活能力及寿命，并能潜在地改善被引入经遗传修饰的干细胞的组织的存活能力。因治疗性应用和/或细胞治疗而将经遗传修饰的干细胞引入哺乳动物个体时(例如在充血性心力衰竭和/或急性心急梗塞中，使心肌组织再生、恢复心肌功能或保护心功能)，过量表达的趋化因子和/或趋化因子受体能够减缓经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它(例如用于使心肌结构再生的)干细胞的凋亡。过量表达的趋化因子和/或趋化因子受体也能潜在地减缓被遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞治疗的哺乳动物个体的组织中的凋亡。

哺乳动物个体可包括任何哺乳动物，如人、大鼠、小鼠、猫、狗、山羊、绵羊、马、猴、猿、兔、牛等。哺乳动物个体可处于发育的任意阶段，包括成体、年幼动物、新生儿。哺乳动物个体还可包括处于胎儿发育期的个体。

依据本发明，MSCs 为形成性多能性胚细胞或胚胎细胞，能分化为特定类型的结缔组织(即体内支持特化元件的组织，尤其包括脂肪组织、骨组织、软骨组织、弹性组织、肌肉组织以及纤维结缔组织，取

决于体内或体外各种环境的影响)。这些细胞存在于骨髓、血液、真皮以及骨膜中，并可采用多种熟知的方法分离及纯化，如在授予 Caplan 和 Haynesworth 的第 5,197,985 号美国专利(在此并入本文作为参考)以及众多其它参考文献中所公开的方法其它。

依据本发明，MAPCs 包括成体祖细胞或干细胞，它们能够分化为它们通常所驻留的组织之外的细胞类型(即表现出可塑性)。MAPCs 的实例可包括成体 MSCs 以及造血祖细胞。MAPCs 的来源可包括骨髓、血液、眼组织、真皮、肝脏以及骨骼肌。举例来说，包括造血祖细胞在内的MAPCs可采用在第5,061,620号美国专利(在此并入本文作为参考)以及众多其它参考文献中所公开的方法分离及纯化其它。

依据本发明，其它干细胞类型包括成体祖细胞或干细胞，其能够分化为组织或器官系统内特化或部分特化的细胞。在本发明的一方面，其它干细胞类型可包括成体祖细胞或干细胞，这些细胞能够分化为心肌细胞或包括血管在内的其它心肌结构，且其中 CXCR4 和/或 SDF-1 的过量表达可导致：(i) 提高干细胞的存活能力，(ii) 增强被修饰的干细胞向梗塞的心肌的归集和/或植入，(iii)提高移入干细胞的周围组织的存活能力或减缓其凋亡，和/或(iv) 促进内源性循环干细胞归集至梗塞心肌。

CXCR4 的过量表达

在本发明的一方面，MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可经遗传修饰而过量表达 CXC 趋化因子受体 4(CXCR4)。CXCR4，又名 CD 184、白细胞衍生的 7 次跨膜结构域受体(LESTR)、神经肽 Y 受体 Y3 (NPY3R)、HM89 以及 FB22，是 G 蛋白偶联受体，对单一 CXC-基序趋化因子即基质细胞衍生因子-1 (SDF1)具有选择性。CXCR4 在成熟血细胞以及造血祖细胞中介导趋化性，并与其配体 SDF1 一起为 B 淋巴细胞形成和骨髓形成所必需。除造血作用外，CXCR4 还负责心室隔膜的形成、胃肠道的血管形成以及小脑颗粒细胞的发育。

现已知包括人、小鼠和大鼠在内的多种不同哺乳动物的 CXCR4 多肽(或蛋白质)的氨基酸序列。这些多肽通常包含 352 个氨基酸。依

据本发明，过量表达的 CXCR4 多肽可具有与上述哺乳动物的 CXCR4 多肽中的一种大致相同的氨基酸序列。举例来说，过量表达的 CXCR4 可具有与 SEQ ID No:1 大致相同的序列。SEQ ID No:1 包含人 CXCR4 的氨基酸序列，并被鉴定为 GenBank 登录号 P61073。过量表达的 CXCR4 也可具有与 SEQ ID No:2 大致相同的序列。SEQ ID No:2 包含小鼠 CXCR4 的氨基酸序列，并被鉴定为 GenBank 登录号 O08565。

依据本发明，过量表达的 CXCR4 也可为哺乳动物 CXCR4 的变体(variant)，如哺乳动物 CXCR4 的片段、类似物和衍生物。这些 CXCR4 变体例如包括由天然 CXCR4 基因(即天然存在的核酸，编码天然存在的哺乳动物 CXCR4 多肽) 自然产生的等位基因变体编码的多肽、由天然 CXCR4 基因的可变剪接(alternative splice)形式编码的多肽、由天然 CXCR4 基因的同源基因(homolog)或直系同源基因(ortholog)编码的多肽，以及由天然 CXCR 基因的非自然产生的变体编码的多肽。

CXCR4 变体的多肽序列与天然 CXCR4 多肽之间有一个或多个氨基酸的不同。这些变体的多肽序列可以 CXCR4 变体的一个或多个氨基酸的缺失、增加或置换为特征。氨基酸的插入优选为 1-4 个邻接的氨基酸，而缺失优选为 1-10 个邻接的氨基酸。CXCR4 多肽变体基本保留有天然 CXCR4 的功能活性。本发明中优选的 CXCR4 多肽变体可通过表达核酸分子而产生，其以沉默变异或保守性变异为特征。

对应于一种或多种特定基序和/或结构域或对应于任意长度的 CXCR4 多肽片段都在本发明的范围之内。分离的 CXCR4 肽段可通过筛选由编码此多肽的核酸上的对应片段经重组产生的多肽而得到。举例来说，本发明中的 CXCR4 多肽可被任意分割为所需长度的片段且片段间无重叠，或优选地分割为所需长度的有重叠的片段。这些片段可以重组方式制备，并经检测以鉴定那些具有天然 CXCR4 多肽激动剂功能的肽段。

CXCR4 多肽的变体也可包括 CXCR4 多肽的重组体形式。除 CXCR4 多肽之外，本发明优选的重组多肽由与编码哺乳动物 CXCR4 多肽的基因核酸序列有至少约 70%的序列一致性的核酸来编码。

CXCR4 多肽变体可包括蛋白的激动形式，其组成型地表现天然

CXCR4 多肽的功能活性。其它 CXCR4 多肽变体可包括抗蛋白水解的变体，例如，其由于突变而改变了蛋白酶的靶序列。通过检测变体的天然 CXCR4 多肽功能活性，可方便地确定多肽氨基酸序列的改变是否产生了具有天然 CXCR4 多肽的一种或多种功能活性的变体。

依据本发明，MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可被编码 CXCR4 或 CXCR4 变体的核酸其它遗传修饰。核酸可以为天然或非天然核酸，为 RNA 形式或 DNA(如 cDNA、基因组 DNA 和合成的 DNA)形式。该 DNA 可为双链或单链，若为单链则可为编码链(有义链)或非编码链(反义链)。编码 CXCR4 多肽的核酸编码序列可与 CXCR4 基因的核苷酸序列大致相同，如 SEQ ID No:3 和 SEQ ID No:4 中现示的核苷酸序列。SEQ ID No:3 和 SEQ ID No:4 分别包含人 CXCR4 与大鼠 CXCR4 的核酸序列，并且与 GenBank 登录号 BC020968 和 GenBank 登录号 BC031655 的核酸序列大致相同。CXCR4 的核酸编码序列也可为不同的编码序列，其由于遗传密码的冗余性或简并性，可编码与 SEQ ID No:3 和 SEQ ID No:4 相同的多肽。

本发明中其它编码 CXCR4 的核酸分子为天然 CXCR4 基因的变体，如编码天然 CXCR4 多肽的片段、类似物和衍生物的核酸分子。这些变体例如可能是天然 CXCR4 基因的自然产生的等位基因变体、天然 CXCR4 基因的同源基因或直系同源基因、以及天然 CXCR4 基因的非自然产生的变体。这些变体具有与天然 CXCR4 基因相差一个或多个碱基的核苷酸序列。例如，这些变体的核苷酸序列可以天然 CXCR4 基因的一个或多个核苷酸的缺失、增加或置换为特征。核酸插入优选为 1-10 个邻接的核苷酸，缺失优选为 1-10 个邻接的核苷酸。

在其它应用中，在结构上显示实质改变的 CXCR4 多肽变体可通过不至于导致被编码多肽发生保守改变的核苷酸置换来产生。这类核苷酸置换的实例会导致(a)多肽主链结构的改变；(b)多肽电荷或疏水性的改变；或(c)氨基酸侧链大小的改变。一般预期使蛋白质性能产生最大改变的核苷酸置换会在密码子中产生非保守性改变。可能导致多肽结构重大改变的密码子改变的实例为(a) 导致亲水基(如丝氨酸或苏氨酸)置换疏水性残基(如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙氨

酸)，或相反；(b) 导致半胱氨酸或脯氨酸置换其它残基，或相反；(c) 导致具有带正电荷侧链的残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)置换带负电荷的残基(如谷氨酰胺，天冬酰胺(aspartine))，或相反；(d) 导致具有大侧链的残基(如苯丙氨酸)取代无侧链的残基(如甘氨酸)，或相反。

本发明中天然 CXCR4 基因自然产生的等位基因变体是分离自哺乳动物组织的核酸，其与天然 CXCR4 基因有至少约 70%的序列一致性，并编码与天然 CXCR4 多肽具有结构相似性的多肽。本发明中天然 CXCR4 基因的同源基因是分离自其它物种的核酸，其与天然基因有至少约 70%的序列一致性，并编码与天然 CXCR4 多肽具有结构相似性的多肽。可搜索公共和/或私有的核酸数据库，以鉴别其它与天然 CXCR4 基因有较高(如 70%或以上)序列一致性的核酸分子。

非天然产生的 CXCR4 基因变体是不存在于自然界中的核酸(如人工制备的)，与天然 CXCR4 基因有至少约 70%的序列一致性，并编码与天然 CXCR4 多肽具有结构相似性的多肽。非天然产生的 CXCR4 基因变体的实例为编码天然 CXCR4 蛋白质的片段的变体、在严紧条件下与天然 CXCR4 基因或天然 CXCR4 基因的互补链杂交的变体，以及与天然 CXCR4 基因或天然 CXCR4 基因的互补链有至少 65%的序列一致性的变体。

本发明中编码天然 CXCR4 基因片段的核酸为编码天然 CXCR4 多肽的氨基酸残基的核酸。编码编码天然 CXCR4 多肽片段的核酸或与编码天然 CXCR4 多肽片段的核酸杂交的较短的寡核苷酸可被用作探针、引物、或反义分子。编码编码天然 CXCR4 多肽片段或与编码天然 CXCR4 多肽片段的核酸杂交的较长的多核苷酸也可被用于本发明的多个方面。编码天然 CXCR4 片段的核酸可通过对全长天然 CXCR4 基因或其变体的酶消化(例如，用限制性内切酶)或化学降解而制得。

在严紧条件下可与前述核酸之一杂交的核酸也可在本发明中使用。例如，在低严紧条件、中严紧条件或高严紧条件下与前述核酸之一杂交的这些核酸处于本发明范围内。

本发明也可使用编码 CXCR4 融合蛋白的核酸分子。此核酸可通过制备在被引入合适的靶细胞时表达 CXCR4 融合蛋白的构建体(如表

达载体)而制得。例如，此构建体可通过将编码 CXCR4 蛋白的第一多核苷酸与编码其它蛋白的第二多核苷酸同框(in frame)融合连接而制得，从而当处于适宜的表达系统中时此构建体的表达能产生融合蛋白。

用于过量表达 CXCR4 的核酸可在诸如碱基部分、糖基部分或磷酸主链上被修饰，以增强分子的稳定性、促进杂交等。本发明中的核酸还可能另含其它附属基团，例如肽(例如为了在体内靶向靶细胞受体)，或利于跨细胞膜转运以及杂交触发的裂解的试剂。为此，核酸可偶联至其它分子(例如肽、杂交触发的交联剂、转运试剂、杂交触发的裂解试剂等。

CXCR4 可由 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达，例如这可通过在 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的培养期内向干细胞中引入提高 CXCR4 表达的试剂来实现。依据本发明以及以上所述，此试剂可包括天然或合成的核酸(如外源遗传物质)，其被并入重组核酸构建体(典型的为 DNA 构建体)，此构建体可被引入细胞并在细胞内复制。此构建体优选包括复制系统以及能够在给定的靶细胞内转录和翻译多肽编码序列的序列。

其它试剂也可被引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以促进干细胞对 CXCR4 的表达。例如，促进 CXCR4 编码基因转录的试剂、促进编码 CXCR4 的 mRNA 的翻译的试剂，和/或减少编码 CXCR4 的 mRNA 降解的试剂可被用于提高 CXCR4 的水平。提高细胞内基因的转录速率可通过在 CXCR4 编码基因的上游引入外源启动子来实现。促进异源基因表达的增强子元件也可被用到。

将试剂引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的优选方法包括使用基因疗法。基因疗法指基因转移以在体内或体外从细胞表达治疗性产物。依据本发明，基因疗法可被用于在体内、离体和/或体外从 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞表达 CXCR4。

基因疗法的一种方法使用包含编码 CXCR4 的核苷酸的载体。“载体”(常称为基因递送或基因转移的“交通工具”)指待递送至靶细胞的包含多核苷酸的高分子或分子复合体，无论是在体外还是体内。待引入的多核苷酸可包含在基因疗法中有益的编码序列。载体例如包括

病毒载体(如腺病毒('Ad')、腺相关病毒(AAV)、慢病毒和逆转录病毒)、脂质体及其它含脂复合体，以及其它能够介导多核苷酸向靶细胞(即MSCs、MAPCs和/或其它干细胞)递送的高分子复合体。

载体也可包含其它进一步调节基因递送和/或基因表达，或者使靶细胞获得有益性能的组分或功能性。这些其它组分包括例如影响结合或靶向细胞的的组分(包括介导对细胞类型或组织特异性结合的组分)；影响细胞对载体核酸吸收的组分；影响多核苷酸被吸收后在细胞内定位的组分(如介导核定位的试剂)；以及影响多核苷酸表达的组分。这些组分也可包括标记物，例如可检测和/或可选择的标记物，其可被用于检测或选择已经吸收并开始表达被载体递送的核酸的细胞。这些组分可作为载体的天然特征而被提供(如使用特定的病毒载体，其具有介导结合和吸收的组分或功能性)，或者载体可经修饰而提供这些功能性。

选择性标记物可为阳性、阴性或双功能的。阳性可选择标记物使带有标记物的细胞被选择，而阴性可选择标记物使带有标记物的细胞被选择性排除。多种这样的标记物基因已被描述，包括双功能性的(即阳性/阴性)标记物(参见，诸如 Lupton, S., WO 92/08796, 1992 年 5 月 29 日公布；以及 Lupton, S., WO 94/28143, 1994 年 12 月 8 日公布)。这些标记物基因可在基因治疗前后提供有利的额外控制措施。在本领域已知有多种这样的载体被广泛使用。

可用在本发明中的载体包括病毒载体、基于脂质的载体以及其它能够将本发明的核苷酸递送至 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的载体。载体可为靶向载体(targeted vector)，尤其是优先与 MSCs、MAPCs和/或其它干细胞结合的靶向载体。本发明优选使用的病毒载体为对靶细胞呈现低毒性且能诱导产生治疗有益量的 CXCR4 的病毒载体。

可用于遗传修饰 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的病毒载体的一个实例为逆转录病毒。逆转录病毒在遗传修饰 MSCs 中的使用已在第 5,591,625 号美国专利中公开。逆转录病毒的结构和生命周期使其成为适于基因转移的理想媒介，因为(i) 大部分编码其结构基因的序列被删除并被目的基因取代，后者在逆转录病毒长末端重复(LTR)区内的调控

序列的控制下被转录; (ii) 它们通过整合入宿主基因组的 DNA 中间体复制。尽管在宿主基因组中的整合位点呈现随机性,但前病毒(provirus)以低拷贝数整合于限定的结构。

逆转录病毒可为 RNA 病毒,即病毒基因组为 RNA。但是,这种基因组 RNA 逆转录为 DNA 中间体,其高效地整合入被感染细胞的染色体 DNA 中。这种整合的 DNA 中间体被称为前病毒。逆转录病毒的基因组和前病毒 DNA 有三个基因: gag、pol 和 env,两侧为两个长末端重复 (LTR) 序列。gag 基因编码内部结构(核衣壳)蛋白,pol 基因编码 RNA 指导的 DNA 聚合酶(逆转录酶); 而 env 基因编码病毒的包膜糖蛋白。5'端和 3'端的 LTR 负责启动病毒 RNA 的转录和多聚腺苷酸化。

5'端 LTR 附近为基因组逆转录(tRNA 引物的结合位点)以及病毒 RNA 被高效包裹形成病毒粒子(Psi 位点)所必需的序列。Mulligan, R. C., In: Experimental Manipulation of Gene Expression (基因表达实验操作), M. Inouye (ed). Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 81 :6349-6353 (1984)。

为产生包含重组基因组的病毒粒子,有必要培养提供包装"协助"的细胞系。为此,编码诸如逆转录病毒的结构基因 gag、pol 和 env 的质粒经常规磷酸钙介导的 DNA 转染法(Wigler, *et al.*, Cell 11 :223 (1977))被引入其它未经转化的组织细胞系。含有这种质粒的细胞被称为"包装细胞系(packaging cell line)"。含有这些质粒的包装细胞系可被如此维持,或者复制缺陷型逆转录病毒载体可被引入这些细胞的基因组。在后一种情况中,载体构建体产生的基因组 RNA 与包装细胞系内组成型表达的逆转录病毒结构基因结合,导致逆转录病毒粒子释放至培养基中。包含逆转录病毒结构基因序列的稳定细胞系是逆转录病毒的"生产者细胞系(producer cell line)"。

由于基因可经逆转录病毒载体引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞,它们可"处于"(受制于)逆转录病毒载体的控制; 在此情况中,目的基因从逆转录病毒的启动子开始转录。启动子是一段特殊的核苷酸序列,能被启动 RNA 合成的 RNA 聚合酶分子识别。或者,可使用具

有负责转录目的遗传物质的额外启动子元件(除了并入重组逆转录病毒的启动子之外)的逆转录病毒。例如，可使用受外部的因子或信号调控的额外启动子的构建体，使得能通过刺激外部信号因子从而控制MSCs、MAPCs和/或其它干细胞产生多肽的水平。例如，编码热休克蛋白的基因的启动子受温度调控。金属硫蛋白(metallothionine)为含金属的蛋白质，其编码基因的启动子对镉离子(Cd^{++})有响应。将受外部信号影响的这种或其它启动子并入，也使得对工程化的祖细胞产生多肽加以调控成为可能。

除逆转录病毒之外，其它可用于遗传改变或遗传修饰 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的载体实例可来自腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)。人及非人病毒载体都可使用，但优选在人体内复制缺陷型的重组病毒载体。当载体为腺病毒时，优选包含具有可操作地连接CXCR4编码基因的启动子的多核苷酸，并在人体内为复制缺陷型。

腺病毒载体能够使基因在靶细胞中高效表达，并能容纳相对大量的异源(非病毒的)DNA。重组腺病毒的优选形式为“无肠的(gutless)”、“高容量的”或者“依赖协助的”腺病毒载体。这样的载体具有诸如以下的特征：(1) 缺失全部或大部分病毒编码序列(编码病毒蛋白的序列)，(2) 病毒 DNA 复制所需的病毒反向末端重复(ITRs)序列，(3) 高达 28-32 kb 的“外源”或“异源”序列(如 CXCR4 的编码序列)，以及(4) 将病毒基因组包入传染性衣壳所需的病毒 DNA 包装序列。特别对于心肌细胞，优选的此重组腺病毒载体的变体包含组织特异性的(如MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)，可操作地与 CXCR4 基因连接的增强子和启动子。

基于腺相关病毒的载体是有利的，由于其对靶细胞有极高的转导效率，并能以位点特异性的方式整合入靶基因组。重组 AAV 载体的使用在 Tal, J., J. Biomed. Sci. 7:279-291, 2000 和 Monahan and Samulski, Gene Therapy 7:24-30,2000 中有详细讨论。优选的 AAV 载体包含一对 AAV 反向末端重复，其位于至少一个表达盒(cassette)的两侧，该表达盒包含可操作地连接到 CXCR4 核酸的组织或细胞特异性启动子。包含 ITRs、启动子和 CXCR4 基因的 AAV 载体的 DNA 序列可整合入靶

基因组。

依据本发明可用的其它病毒载体包括基于单纯疱疹病毒(HSV)的载体。缺失一个或多个中早期基因(IE)的 HSV 载体是有利的，由于其通常无细胞毒性，在靶细胞中保持近似潜伏的状态，以及提供高效的靶细胞转导。重组 HSV 载体可容纳近 30 kb 的异源核酸。优选的 HSV 载体应满足: (1) 从 I 型 HSV 工程化，(2) 其 IE 基因缺失，以及(3) 包含可操作地连接到 SDF-1 核酸的组织特异性(例如心肌的)启动子。HSV 扩增子载体也可在本发明的多种方法中用到。典型地，HSV 扩增子载体长度约为 15 kb，并具有病毒复制起点及包装序列。

基于 α 病毒的载体，例如由圣利基森林病毒(semliki forest virus，SFV)和辛德毕斯病毒(Sindbis virus，SIN)制得的载体，也可在本发明中使用。α 病毒的使用在 Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 和 Perri *et al.*, Journal of Virology 74:9802-9807, 2000 中有描述。α 病毒载体典型地以复制子的形式构建。复制子可包含(1) RNA 复制所需的 α 病毒基因元件，和(2) 异源的核酸，如编码 CXCR4 的核酸。在 α 病毒复制子内，异源核酸可与组织特异性的启动子或增强子可操作地连接。

重组的复制缺陷型 α 病毒载体是有利的，由于其能够高水平地表达异源(治疗性的)基因，以及其能转染广谱的靶细胞。α 病毒复制子可通过在其病毒粒子表面展示功能性异源配体或结合结构域，使得能与表达相关结合伙伴(cognate binding partner)的靶细胞选择性结合，从而被定向于特定靶细胞类型(如 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)。α 病毒复制子可处于潜伏状态，并因此使得靶细胞内异源核酸能长期表达。复制子也可在靶细胞内表现瞬时异源核酸表达。优选的 α 病毒载体或 α 病毒复制子为非细胞致病性的。

在许多适用于本发明方法的病毒载体中，多于一个启动子可被包含于载体中以允许多于一个异源基因被载体表达。此外，载体也可包含编码信号肽或其它部分的序列，其有利于靶细胞对 CXCR4 基因产物的表达。

为将这两种病毒载体系统的优势属性结合起来，可使用杂交病毒载体将 CXCR4 核酸递送至 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞。构建杂

交载体的标准技术为本领域技术人员所熟知。此技术可在诸如Sambrook, *et al.*, In Molecular Cloning: A laboratory manual(分子克隆实验室手册). Cold Spring Harbor, N.Y.或任一论述重组 DNA 技术的实验室手册中找到。腺病毒衣壳内包含 AAV 和腺病毒 ITRs 结合体的双链 AAV 基因组可被用于对细胞的转导。在另一变化形式中，AAV 载体可被置于“无肠的”，“依赖协助的”或“高容量的”腺病毒载体内。腺病毒/AAV 杂交载体在 Lieber *et al.*, J. Virol. 73:9314-9324, 1999 中有论述。逆转录病毒/腺病毒杂交载体在 Zheng et al., Nature Biotechnol. 18: 176-86, 2000 中有所论述。包含在腺病毒内的逆转录病毒基因组可整合入靶细胞基因组，并实现稳定的 CXCR4 基因表达。

进一步考虑了其它有利于 CXCR4 基因表达及有利于载体克隆的核苷酸序列元件。举例来说，启动子上游的增强子或例如编码区下游的终止子的存在可对表达有利。

除以病毒载体为基础的方法之外，非病毒方法也可被用于将 CXCR4 基因引入靶细胞。关于基因递送的非病毒方法在 Nishikawa and Huang, Human Gene Ther. 12:861-870, 2001 中提供了综述。依据本发明，优选的非病毒基因递送方法使用质粒 DNA 将 CXCR4 核酸引入细胞。基于质粒的基因递送方法为本领域内所共知。

合成的基因转移分子可被设计为与质粒 DNA 形成多分子集合体。这些集合体可被设计为与 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞结合。

阳离子两性分子，包括脂多胺(lipopolyamine)和阳离子脂质可被用于使 CXCR4 核酸向 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞内不依赖受体的转移。此外，预制的阳离子脂质体或阳离子脂质可与质粒 DNA 混合，以生成细胞转染复合体。有关阳离子脂质配制的方法综述在 Felgner *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 772: 126-139, 1995 和 Lasic and Templeton, Adv. Drug Delivery Rev. 20:221-266, 1996 中。为了基因递送，DNA 也可与两性的阳离子肽结合(Fominaya *et al.*, J. Gene Med. 2:455-464,2000)。

依据本发明可使用同时包含病毒成分和非病毒成分的方法。举例来说，用于治疗性基因递送的基于 EB 病毒(Epstein Barr virus，EBV)的质粒在 Cui *et al.*, Gene Therapy 8: 1508-1513, 2001 中有描述。另外，

涉及与腺病毒结合的DNA/配体/聚阳离子附属物的方法在Curiel, D. T., Nat. Immun. 13:141-164, 1994中有描述。

包含有编码表达 CXCR4 的核酸的载体可通过直接注射入培养基而被引入离体或体外培养的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞中。可注射的制剂可在需要时包含药物可接受的载体，如生理盐水。依据本发明也可使用其它药物载体、制剂和剂量。

经遗传修饰以过量表达CXCR4的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞，当其因治疗性应用和/或细胞疗法而被引入哺乳动物个体时，相比于未经遗传修饰以过量表达 CXCR4 的 MSCs 其它来说，具有更强的存活能力以及更长的寿命。由遗传修饰的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞过量表达的 CXCR4 可与接受治疗的组织中存在的趋化因子SDF-1结合。SDF-1与CXCR4的结合可诱导蛋白激酶AKT的磷酸化，继而减缓MSCs、MAPCs和/或其它干细胞的凋亡并大大增强其存活能力。

SDF-1 的过量表达

依据本发明的另一方面，MSCs、MAPCs和/或其它干细胞可经遗传修饰而过量表达基质细胞衍生因子-1(SDF-1)。SDF-1，又名CXC趋化因子L12，是CXC家族趋化因子中的一员，并被认为是CXCR4的天然配体。SDF-1 在功能上不同于其它趋化因子，因据报告其基本功能为负责骨髓祖细胞的运输、输出及归集。SDF-1 在结构上也不同于其它CXC趋化因子，因其与它们仅有22%的氨基酸序列一致性。SDF-1序列在种间的高度保守性暗示了 SDF-1 的重要生理功能。在体外，SDF-1 激发包括单核细胞和骨髓起源的祖细胞在内的广泛的细胞的趋化性。

已知包括人、小鼠以及大鼠在内的许多不同哺乳动物的SDF-1的氨基酸序列。人与大鼠的 SDF-1 氨基酸序列具有约 92%的一致性。SDF-1可包含两种异构型，SDF-1 α和SDF-1 β，它们在本文中除另加鉴别外都被称为SDF-1。

过量表达的SDF-1可具有与SEQ ID NO: 5大致相同的氨基酸序

列。过量表达的 SDF-1 也可具有与前述哺乳动物的 SDF-1 大致相同的氨基酸序列。例如，过量表达的 SDF-1 可具有与 SEQ ID NO: 6 大致相同的氨基酸序列。基本上包含 SEQ ID NO: 5 的 SEQ ID NO: 6 是人 SDF 的氨基酸序列，并被鉴定为 GenBank 登录号 NP954637。过量表达的 SDF-1 也可具有与 SEQ ID NO: 7 大致相同的氨基酸序列。也基本上包含 SEQ ID NO: 5 的 SEQ ID NO: 7 包含大鼠 SDF 的氨基酸序列，被鉴定为 GenBank 登录号 AAF01066。

依据本发明，过量表达的 SDF-1 多肽也可为哺乳动物 SDF-1 的变体，如哺乳动物 SDF-1 的片段、类似物和衍生物。这些 SDF-1 变体例如包括由天然 SDF-1 基因(即天然产生的核酸，其编码天然产生的哺乳动物 SDF-1 多肽)自然产生的等位基因变体编码的多肽、由天然 SDF-1 基因的可变剪接形式编码的多肽、由天然 SDF-1 基因的同源基因或直系同源基因编码的多肽，以及由天然 SDF-1 基因的非自然产生的变体编码的多肽。

SDF-1 变体的多肽序列与天然 SDF-1 多肽之间有一个或多个氨基酸的差异。这些变体的多肽序列可以 SDF-1 变体的一个或多个氨基酸的缺失、增加或置换为特征。氨基酸的插入优选为 1-4 个邻接的氨基酸，而其缺失优选为 1-10 个邻接的氨基酸。SDF-1 多肽变体基本保留有天然 SDF-1 的功能活性。本发明中优选的 SDF-1 多肽变体可通过表达核酸分子而产生，其以沉默变异或保守性变异为特征。

对应于一种或多种基序和/或结构域或对应于任意长度的 SDF-1 多肽片段都在本发明的范围之内。分离的 SDF-1 肽段可通过筛选由编码该多肽的核酸上对应片段重组生成的多肽而得到。例如，本发明中的 SDF-1 多肽可被任意分割为所需长度的无重叠的片段，或优选分割为所需长度的有重叠的片段。这些片段可以重组方式制备，并经检测以鉴别那些具有天然 CXCR4 多肽激动剂功能的肽段。

SDF-1 多肽的变体也可包括 SDF-1 多肽的重组体形式。除 SDF-1 多肽之外，本发明优选的重组多肽由与编码哺乳动物 SDF-1 多肽的基因核酸序列有至少 70%的序列一致性的核酸来编码。

SDF-1 变体可包括蛋白的激动形式，其组成型地表现天然 SDF-1

的功能活性。其它 SDF-1 变体可包括抗蛋白水解的变体，例如由于突变而改变了蛋白酶的靶序列。通过检测变体的天然 SDF-1 多肽功能活性，可以方便地确定多肽氨基酸序列的改变是否产生了具有天然 SDF-1 多肽的一种或多种功能活性的变体。

依据本发明，MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可以用编码 SDF-1 或 SDF-1 变体的核酸其它遗传修饰。核酸可为天然或非天然核酸，为 RNA 形式或 DNA(如 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA)形式。该 DNA 可为单链或双链，若为单链则可为编码链(有义链)或非编码链(反义链)。编码 SDF-1 的核酸编码序列可与 SDF-1 基因的核苷酸序列大致相同，如 SEQ ID No:8 和 SEQ ID No:9 中显示的核苷酸序列。SEQ ID No:8 和 SEQ ID No:9 分别包含人 SDF-1 和大鼠 SDF-1 的核酸序列，并与 GenBank 登录号 NM199168 和 GenBank 登录号 AF189724 的核酸序列大致相同。SDF-1 序列的编码核酸也可为不同的编码序列，其由于遗传密码的冗余性和简并性，编码与 SEQ ID No:5、SEQ ID No:6 以及 SEQ ID No:7 相同的多肽。

本发明中其它编码 SDF-1 的核酸分子为天然 SDF-1 的变体，如编码天然 SDF-1 多肽的片段、类似物和衍生物的核酸分子。这些变体可能例如是天然 SDF-1 基因的自然产生的等位基因变体、天然 SDF-1 基因的同源基因或直系同源基因、或天然 SDF-1 基因的非自然产生的变体。这些变体具有与天然 SDF-1 基因有一个或多个碱基差异的核苷酸序列。例如，这些变体的核苷酸序列可以天然 SDF-1 基因的一个或多个核苷酸的缺失、增加或置换为特征。核酸插入优选为约 1-10 个邻接的核苷酸，缺失优选为约 1-10 个邻接的核苷酸。

在其它应用中，在结构上显示实质改变的 SDF-1 多肽变体可通过不至于导致被编码的多肽发生保守性改变的核苷酸置换来产生。这类核苷酸置换的实例会导致(a)多肽主链结构的改变；(b)多肽电荷或疏水性的改变；或(c)氨基酸侧链大小的改变。一般预期会使蛋白属性产生最大改变的核苷酸置换会使得密码子发生非保守性改变。可能导致蛋白结构重大改变的密码子改变的实例为(a) 导致亲水残基(如丝氨酸或苏氨酸)置换疏水残基(如亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、缬氨酸或丙

氨酸)，或相反；(b) 导致半胱氨酸或脯氨酸置换任何其它残基，或相反；(c) 导致具有带正电荷侧链的残基(如赖氨酸、精氨酸或组氨酸)置换带负电荷的残基(如谷氨酰胺，阿斯巴甜)，或相反；或(d) 导致具有大体积侧链的残基(如苯丙氨酸)取代无侧链的残基(如甘氨酸)，或相反。

本发明中天然 SDF-1 基因的自然产生的等位基因变体是分离自哺乳动物组织的核酸，其与天然 SDF-1 基因有至少 70%的序列一致性，并编码与天然 SDF-1 多肽具有结构相似性的多肽。本发明中天然 SDF-1 基因的同源基因是分离自其它物种的核酸，其与天然基因有至少 70%的序列一致性，并编码与天然 SDF-1 多肽具有结构相似性的多肽。可搜索公共和/或私有的核酸数据库，以鉴别其它与天然 SDF-1 基因有较高(如 70%或以上)序列一致性的核酸分子。

非自然产生的 SDF-1 基因变体是不存在于自然界中的核酸(如人工制备的)，与天然 SDF-1 基因有至少约 70%的序列一致性，并编码与天然 SDF-1 多肽具有结构相似性的多肽。非自然产生的 SDF-1 基因变体的实例为可编码天然 SDF-1 蛋白质的片段的变体、在严紧条件下与天然 CXCR4 基因或天然 SDF-1 基因的互补链杂交的变体，以及与天然 SDF-1 基因或天然 SDF-1 基因的互补链享有至少 65%序列一致性的变体。

本发明中编码天然 SDF-1 基因片段的核酸即编码天然 SDF-1 多肽的氨基酸残基的核酸。编码编码天然 SDF-1 片段的核酸或与编码天然 SDF-1 片段的核酸杂交的较短的寡核苷酸可被用作探针、引物、或反义分子。编码编码天然 SDF-1 片段的核酸或与编码天然 SDF-1 片段的核酸杂交的较长的多核苷酸也可被用于本发明的多个方面。编码天然 SDF-1 片段的核酸可通过对全长天然 SDF-1 基因或其变体的酶消化(例如，用限制性内切酶)或化学降解而制得。

在严紧条件下可与前述核酸之一杂交的核酸也可在本发明中使用。例如，这些核酸是可在低严紧条件、中严紧条件或高严紧条件下与前述核酸之一杂交的核酸，这些核酸在本发明范围内。

本发明也可使用编码 SDF-1 融合蛋白的核酸分子。这种核酸可通

过制备在被引入合适的靶细胞中时表达 SDF-1 融合蛋白的构建体(如表达载体)而制得。举例来说，这种构建体可通过将编码 SDF-1 蛋白的第一多核苷酸与编码其它蛋白的第二多核苷酸同框融合连接而制得，从而在适宜的表达系统中该构建体的表达能产生融合蛋白。

用于过量表达 SDF-1 的核酸可在例如碱基部分、糖基部分或磷酸基骨架上被修饰，以增强分子的稳定性、促进杂交等。本发明中的核酸还可另外包含其它附属基团，如肽(例如为了在体内靶向靶细胞受体)，或利于跨细胞膜转运、杂交触发的裂解的试剂。为此，核酸与其它分子(例如，肽)、杂交触发的交联剂、转运试剂、杂交触发的裂解试剂等结合。

SDF-1 可由 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达，这可通过向干细胞中引入提高 SDF-1 表达的试剂来实现。依据本发明以及以上所述，该试剂可包括天然或合成的核酸，它们被并入重组核酸构建体(典型地为 DNA 构建体)，该构建体可被引入细胞并在细胞内复制。该构建体优选包括复制系统以及能够在给定的靶细胞内转录和翻译多肽编码序列的序列。

其它试剂也可被引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以提高干细胞对 SDF-1 的表达。例如，增强 SDF-1 编码基因转录的试剂、增强编码 SDF-1 的 mRNA 的翻译的试剂，和/或减少编码 SDF-1 的 mRNA 的降解的试剂可被用于提高 SDF-1 蛋白质的水平。提高细胞内基因的转录速率可通过在编码 SDF-1 的基因上游引入外源启动子来实现。可促进异源基因表达的增强子元件也可被使用。

将所述试剂引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的优选方法涉及使用基因疗法。基因疗法的一种方法使用包含编码 SDF-1 的核苷酸的载体。载体例如包括病毒载体(如腺病毒('Ad')、腺相关病毒(AAV)以及逆转录病毒)、脂质体和其它含脂复合体，以及其它能够介导多核苷酸向靶细胞(即 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)的递送的高分子复合体。

载体也可包含其它进一步调节基因递送和/或基因表达，或者使靶细胞获得有益性能的组分或功能性。这些其它组分包括例如影响结合

或靶向细胞的的组分(包括介导对细胞类型或组织特异性结合的组分)；影响细胞对载体核酸吸收的组分；影响多核苷酸被吸收后在细胞内定位的组分(如介导核定位的试剂)；以及影响多核苷酸表达的组分。这些组分也可包括标记物，例如可检测和/或可选择的标记物，其可被用于检测或选择已经吸收并开始表达被载体递送的核酸的细胞。这些组分可作为载体的天然特征而被提供(如使用特定的病毒载体，其具有介导结合和吸收的组分或功能性)，或者载体可经修饰而提供这些功能性。

选择性标记物可为阳性、阴性或双功能的。阳性可选择标记物使带有标记物的细胞被选择，而阴性可选择标记物使带有标记物的细胞被选择性排除。多种这样的标记物基因已被描述，包括双功能性的(即阳性/阴性)标记物(参见，诸如 Lupton, S., WO 92/08796, 1992 年 5 月 29 日公布；以及 Lupton, S., WO 94/28143, 1994 年 12 月 8 日公布)。这些标记物基因可在基因治疗前后提供有利的额外控制措施。在本领域已知有多种这样的载体被广泛使用。

可于本发明的载体包括病毒载体、基于脂质的载体以及其它能够将本发明的核苷酸递送至 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的载体。载体可为靶向载体(targeted vector)，尤其是优先与 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞结合的靶向载体。本发明优选使用的病毒载体为对靶细胞呈现低毒性且能诱导产生治疗有益量的 SDF-1 的病毒载体。

可用于遗传修饰用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的病毒载体的一个实例为逆转录病毒。也可用于遗传改变或遗传修饰干细胞的载体的其它实例可源自腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)。其它为本领域所熟知并在前文中有描述的病毒载体及非病毒载体也可使用。

经遗传修饰以过量表达 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞，当因治疗性应用和/或细胞疗法而被引入哺乳动物个体时，相比于未经遗传修饰以过量表达 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞，具有更强的存活能力以及更长的寿命。由经过遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达的 SDF-1 可与 MSCs、MAPCs 和/

或其它干细胞中存在的 CXCR4 以及接受治疗的组织中存在的 CXCR4 结合。SDF-1 与 CXCR4 的结合可诱导蛋白激酶 AKT 发生磷酸化，继而可减缓 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以及接受治疗的组织的凋亡并大大增强其存活能力。此外，SDF-1 的过量表达可促进用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以及哺乳动物个体内其它祖细胞或干细胞归集至接受治疗的组织。

CXCR4 和 SDF-1 的过量表达

依据本发明的另一方面，MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可经遗传修饰而同时过量表达 CXCR4 和 SDF-1。依据本发明过量表达的 CXCR4 多肽可具有与哺乳动物 CXCR4 多肽的氨基酸序列大致相同的氨基酸序列。例如，过量表达的 CXCR4 可具有与 SEQ ID NO: 1 和/或 SEQ ID NO: 2 大致相同的氨基酸序列。过量表达的 SDF-1 可具有与哺乳动物 SDF-1 的氨基酸序列大致相同的氨基酸序列。例如，过量表达的 SDF-1 可具有与 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 和/或 SEQ ID NO: 7 大致相同的氨基酸序列。

依据本发明过量表达的 CXCR4 和 SDF-1 也可分别为哺乳动物 CXCR4 和哺乳动物 SDF-1 的变体，例如哺乳动物 CXCR4 和哺乳动物 SDF-1 的片段、类似物和衍生物。这些变体例如包括由天然 CXCR4 基因(即天然产生的核酸，其编码天然产生的哺乳动物 CXCR4 多肽)自然产生的等位基因变体编码的多肽、由天然 SDF-1 基因自然产生的等位基因变体编码的多肽、由天然 CXCR4 基因的可变剪接形式编码的多肽、由天然 SDF-1 基因的可变剪接形式编码的多肽、由天然 CXCR4 基因的同源基因或直系同源基因编码的多肽、由天然 SDF-1 基因的同源基因或直系同源基因编码的多肽、由天然 CXCR4 基因的非自然产生的变体编码的多肽和/或由天然 SDF-1 基因的非自然产生的变体编码的多肽。

CXCR4 变体和 SDF-1 变体的多肽序列与天然 CXCR4 和 SDF-1 之间有一个或多个氨基酸的差异。这些变体的肽序列可以 CXCR4 变体和/或 SDF-1 变体的一个或多个氨基酸的缺失、增加或置换为特征。氨

基酸的插入优选为 1-4 个邻接的氨基酸，而缺失优选为 1-10 个邻接的氨基酸。CXCR4 多肽变体基本上保留有天然 CXCR4 的功能活性，而 SDF-1 多肽变体基本上保留有天然 SDF-1 的功能活性。

对应于一个或多个特定基序和/或结构域或对应于任意长度的 CXCR4 和 SDF-1 多肽片段都在本发明的范围之内。CXCR4 和 SDF-1 多肽变体也可包扩 CXCR4 和 SDF-1 多肽的重组体形式。本发明所优选的重组体多肽分别由与编码哺乳动物 CXCR4 和哺乳动物 SDF-1 的基因核酸序列有至少 70%的序列一致性的核酸来编码。

CXCR4 变体和 SDF-1 变体可包括组成型地表现天然 CXCR4 和 SDF-1 的功能活性的蛋白质激动形式。其它 CXCR4 和 SDF-1 变体可包括抗蛋白水解的变体，例如由于突变而改变了蛋白酶的靶序列。

用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞对 CXCR4 和 SDF-1 的过量表达可通过以编码 CXCR4 (或 CXCR4 的变体)和 SDF-1 (或 SDF-1 的变体)的核酸对以上干细胞遗传修饰来实现。该核酸可为天然或非天然核酸，为 RNA 形式或 DNA(如 cDNA、基因组 DNA 和合成 DNA)形式。其 DNA 可为单链或双链，若为单链则可为编码链(有义链)或非编码链(反义链)。

编码 CXCR4 多肽的核酸编码序列可与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 中显示的核苷酸序列大致相同。编码 CXCR4 的核酸编码序列也可为不同的编码序列，但由于遗传密码的冗余性或简并性而编码与 SEQ ID NO: 3 和 SEQ ID NO: 4 相同的多肽。

编码 SDF-1 的核酸编码序列可与 SEQ ID NO: 8 和 SEQ ID NO: 9 中显示的核苷酸序列大致相同。SDF-1 的核酸编码序列也可为不同的编码序列，但由于遗传密码的冗余性或简并性而编码与 SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6 以及 SEQ ID NO: 7 相同的多肽。

本发明中其它编码 CXCR4 和 SDF-1 的核酸分子分别为天然 CXCR4 和天然 SDF-1 的变体，例如编码天然 CXCR4 和天然 SDF-1 的片段、类似物以及衍生物的核酸分子。这些变体可分别具有与天然 CXCR4 基因和 SDF-1 基因在一个或多个碱基上有差异的核苷酸序列。

在其它应用中，在结构上显示实质改变的 CXCR4 变体和 SDF-1

变体可通过进行不至于导致被编码的多肽发生保守性改变的核苷酸置换来产生。本发明中天然 CXCR4 基因和天然 SDF-1 基因自然产生的等位基因变体是分离自哺乳动物组织的核酸，其与天然 CXCR4 基因和天然 SDF-1 基因分别有至少约 70%的序列一致性，并编码与 CXCR4 多肽和天然 SDF-1 多肽具有结构相似性的多肽。

在严紧条件下与前述核酸之一杂交的核酸也可在本发明中使用。例如，那些可在低严紧条件、中严紧条件或高严紧条件下与前述核酸之一杂交的核酸也在本发明范围内。

编码 CXCR4 和 SDF-1 融合蛋白质的核酸分子也可在本发明中使用。这类核酸可通过制备当其被引入适合的靶细胞时表达 CXCR4 和 SDF-1 融合蛋白质的构建体(如表达载体)来制得。

用于过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的核酸可例如在碱基基团、糖基基团或磷酸主链上被修饰，以增强分子的稳定性，促进杂交等。本发明中的核酸还可能另外包含其它的附属基团，例如肽(例如为了在体内靶向靶细胞受体)，或利于跨细胞膜转运、杂交触发的裂解的试剂。为此，核酸可偶联到另一分子，例如肽、杂交触发的交联剂、转运试剂、杂交触发的裂解试剂等。

可通过向 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞中引入至少一种促进 CXCR4 和 SDF-1 表达的试剂而使 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达 CXCR4 和 SDF-1。依据本发明以及以上所述，该试剂可包括天然或合成的核酸，其被并入能引入细胞并在细胞内复制的重组核酸构建体，典型地为 DNA 构建体。这种构建体优选包括复制系统以及能够在给定的靶细胞内转录和翻译多肽编码序列的序列。

其它试剂也可被引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以促进干细胞对 CXCR4 和 SDF-1 的表达。例如，增强编码 CXCR4 和 SDF-1 的基因的转录的试剂，增强编码 CXCR4 和 SDF-1 的 mRNA 的翻译的试剂和/或减弱编码 CXCR4 和 SDF-1 的 mRNA 的降解的试剂可被用于过量表达 CXCR4 和 SDF-1。提高细胞内基因的转录速率可通过在编码 CXCR4 的基因和编码 SDF-1 的基因的上游引入外源启动子来实现。可促进异源基因表达的增强子元件也可被用到。

将所述试剂引入 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的优选方法涉及使用基因疗法。基因疗法的一种方法使用包含编码 CXCR4 的核苷酸的载体和包含编码 SDF-1 的核苷酸的载体。另一种方法使用同时编码 CXCR4 和 SDF-1 的载体。载体例如包括病毒载体(如腺病毒('Ad')、腺相关病毒(AAV)，以及逆转录病毒)、脂质体和其它含脂复合体，以及其它能够介导多核苷酸向靶细胞(即 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞)的递送的高分子复合体。

载体也可包含其它进一步调节基因递送和/或基因表达，或者为靶细胞提供有益性能的组分或功能性。这些其它组分例如包括影响结合或靶向细胞的组分(包括介导细胞类型或组织特异性结合的组分)；影响细胞对载体核酸的摄取的组分；影响多核苷酸被摄取后在细胞内的定位的组分(例如介导核定位的试剂)；以及影响多核苷酸表达的组分。这些组分也可包括标记物，例如可检测和/或可选择的标记物，它们可被用于检测或选择已经吸收并表达被载体递送的核酸的细胞。这些组分可作为载体的天然特性而提供(如带有介导结合和吸收的组分或功能性的某些病毒载体的使用)，或者载体可经修饰而提供这些功能性。

可选择标记物可为阳性、阴性或双功能性。阳性可选择标记物使得能选择带有该标记物的细胞，而阴性可选择标记物使得带有标记物的细胞被选择性排除。多种这样的标记物基因已被表述，包括双功能性(即阳性/阴性)标记物(参见，例如，Lupton, S., WO 92/08796, 1992 年 5 月 29 日公布；以及 Lupton, S., WO 94/28143，1994 年 12 月 8 日公布)。这些标记物基因可在基因治疗前后提供有利的额外控制措施。在本领域已知有多种这样的载体被广泛使用。

本发明中使用的载体包括病毒载体、基于脂质得载体以及其它能够将本发明得核苷酸递送至 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的载体。载体可为靶向载体，尤其是优先与 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞结合的靶向载体。用在本发明中的优选病毒载体为对靶细胞呈现低毒性且能诱导产生治疗有益量得 CXCR4 和 SDF-1 的病毒载体。

可用于遗传修饰 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的病毒载体的一个实例为逆转录病毒。其它的也可用于遗传改变或修饰干细胞的载体

实例可源自腺病毒(Ad)或腺相关病毒(AAV)。其它在本领域内广为人知并在前文中有描述的病毒载体及非病毒载体也可使用。

经遗传修饰以同时过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞，当其因治疗性应用和/或细胞疗法而被引入哺乳动物体个体内时，相比于未经遗传修饰以过量表达 CXCR4 和/或 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞，具有改善的存活能力以及更长的寿命。由用于使心肌结构再生的、经过遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞过量表达的 CXCR4 和 SDF-1 可在干细胞中结合到一起｜以及与存在于待治疗的组织中的 CXCR4 和 SDF-1 结合。如前所述，SDF-1 与 CXCR4 的结合可诱导蛋白激酶 AKT 发生磷酸化，继而减缓 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以及待治疗的组织的凋亡并大大改善其存活能力。此外，CXCR4 和 SDF-1 的过量表达可促进用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以及哺乳动物个体内其它祖细胞或干细胞归集至接受治疗的组织。

治疗性应用

经遗传修饰以过量表达 CXCR4、SDF-1 或同时过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可潜在地被用于任何需要扩展、再定居(repopulate)、维持和/或再生组织和/或器官系统的细胞疗法或治疗性应用。依据本发明的一方面，经遗传修饰以过量表达 CXCR4 的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可被用于治疗患有近期心肌梗塞或充血性心力衰竭的患者。患有近期心肌梗塞或充血性心力衰竭的患者可通过将遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞递送至梗塞心肌组织和/或梗塞心肌组织的邻近组织而得到治疗。被递送至梗塞心肌组织的遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可分化为能够再定居(即植入)并部分或全部恢复梗塞心肌的正常功能的细胞。

可通过将所用的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞直接注射入梗塞心肌组织或邻近梗塞区的心肌组织，将用于使心肌结构再生的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞递送至梗塞心肌。可使用例如结核菌素注射器完成经遗传修饰的干细胞的直接注射。

将遗传修饰的干细胞直接注射入梗塞心肌组织可上调梗塞心肌组织对SDF-1的表达。梗塞心肌组织内SDF-1表达的上调自MSCs、MAPCs和/或其它干细胞被移植入心肌后约1小时至移植后不到7天时被观察到。SDF-1的这种上调可潜在地促使外围血液中的多能性干细胞归集于梗塞心肌。MSCs、MAPCs和/或其它干细胞对CXCR4和/或SDF-1的过量表达增强了遗传修饰的干细胞的存活能力，从而增强治疗效果。

或者，可通过将遗传修饰的干细胞经静脉或动脉注入待治疗的哺乳动物个体，将用于使心肌结构再生的经遗传修饰的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞递送至梗塞心肌组织。对用于使心肌结构再生并过量表达SDF-1和/或CXCR4的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞的输注可在心肌梗塞后不久(如约1天)施行。心肌梗塞引起梗塞心肌组织内SDF-1表达的短暂上调。这种SDF-1表达的上调可潜在地促使被注入哺乳动物外周血中的用于使心肌结构再生的经遗传修饰的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞归集至梗塞心肌组织。用于使心肌结构再生的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞对CXCR4和SDF-1的过量表达增强了经遗传修饰的干细胞的存活能力，这使治疗效果的得到增强。

用于使心肌结构再生的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞一旦被递送至待治疗的组织，可在任意合适的时长内表达CXCR4和/或SDF-1，包括瞬时表达和稳定、长期表达。在优选的实施方案中，CXCR4和/或SDF-1在合适和确定的时长内以治疗量表达。

治疗量为能够在接受治疗的动物或人体内产生医疗所需效果的量。如医学领域内所熟知的，任一动物或人体的所需剂量取决于许多因素，包括体型大小、身体表面积、年龄、给药的具体成分、性别、给药时间和给药途径、综合健康状态，以及同时给药的其它药物。蛋白质、核酸或小分子的具体剂量可容易地由本领域技术人员使用下文所描述的实验方法来确定。

用于使心肌结构再生的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞对CXCR4和/或SDF-1的长期表达是有利的，因为其使得能在远离递送用于使心肌结构再生的经遗传修饰的MSCs、MAPCs和/或其它干细胞的时间点(如心肌梗塞后约2至3天)给予动员剂。给予动员剂可诱导其它干细

胞从组织(如骨髓)动员至个体的外周血，使外周血中干细胞浓度增加。在动员剂为粒细胞集落刺激因子(G-CSF)时，中性白细胞数目显著增多，这在围手术期引起副作用，而不是几天或几周之后。此外，CXCR4和/或 SDF-1 的长期或慢性过量表达导致干细胞自外周血向梗塞心肌组织的长期归集，而无需干细胞动员。

应理解的是，还有多种其它的动员剂为已知的并可用在本发明中。这些动员剂可包括细胞因子，如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素(IL)-7、IL-3、IL-12、干细胞因子(SCF)和 flt-3 配体；趋化因子，如 IL-8、Mip-1α和 Groβ；以及环磷酰胺(cylcophosamide，Cy)和太平洋紫杉醇(paclitaxel)等化疗剂。这些动员剂在实现干细胞动员的时间范围(time frame)、动员的干细胞类型以及效率等方面有所不同。本领域技术人员应理解还可以其它动员剂给药。

可通过将动员剂直接注射入个体而给药。尽管动员剂典型地在用于使心肌结构再生的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞被递送(例如直接注射或输注)至待治疗组织之后给药，但动员剂也可在经遗传修饰的干细胞递送之前给药。

举例而言，图 1 解释了使用 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞治疗急性心急梗塞患者的临床策略，其中 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞经遗传修饰以过量表达 CXCR4 和 SDF-1，用于使心肌结构再生。在该治疗策略中，患有急性心肌梗塞的患者首先经血管成形术治疗。心肌梗塞约 1 天后，将经遗传修饰以过量表达 CXCR4 和 SDF-1 的用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞经动脉或静脉输注至患者体内。用于使心肌结构再生的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可为接受治疗的患者自体的和/或异体的，并可如前文所述被采集、培养以及被遗传修饰。被注入用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的数量可包括例如 200 万个干细胞。这一数量可依据具体应用而调高或调低。

用于使心肌结构再生的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的输注可增加 SDF-1 在梗塞心肌中的表达。增加的 SDF-1 表达可提高 MSCs 和/或 MAPCs 在梗塞心肌内的存活能力以及促进外周血内

其它祖细胞和干细胞向梗塞心肌的归集。

在心肌梗塞约 2 至 3 天后，以 GCS-F 对患者给药约 5 天。GCS-F 可将另外的多潜能祖细胞或干细胞从诸如骨髓等组织中动员至患者的血液供应。由用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞表达的 SDF-1/或 CXCR4 诱导这些外周血中的祖细胞或干细胞进入梗塞心肌。用于使心肌结构再生的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞以及受动员被诱导进入梗塞心肌的的祖细胞或干细胞可有助于心肌再生，并对左心室功能有实质性改善。

应理解，尽管经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞最初被描述为用于治疗急性心肌梗塞或充血性心力衰竭，但依据本发明，这些经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞也可用于其它治疗性应用。例如，本发明的经遗传修饰的 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞可被用于肝细胞的再生以替换受损肝组织并恢复肝功能，可与骨髓移植结合用于化疗和/或放疗致使骨髓消融后的骨髓再生，用于骨和/或软骨的重建，用于纠正肌肉障碍(如肌营养不良)，以及其它使组织再生，或典型利用 MSCs、MAPCs 和/或其它干细胞的治疗性应用。

实施例

下面一系列实施例对本发明进行进一步阐述。提供这些实施例以阐述本发明，而决不应被理解为对本发明范围或内容的限制。

CXCR4 表达对 MSC 归集以及存活能力的影响

为确定遗传修饰 MSCs 以表达 CXCR4 是否影响 MSCs 的存活能力以及向梗塞心肌的归集，将 200 万个 MSCs 和经遗传修饰以表达 CXCR4 的 MSCs 经静脉注入通过左侧上行动脉结扎诱发心肌梗塞 1 天后的大鼠。图 2 显示了在注入 MSCs 和遗传修饰的 MSCs 3 天后，梗塞区域单位面积内 MSCs 和经遗传修饰以表达 CXCR4 的 MSCs 的数量。

单位面积内经遗传修饰的 MSCs 的数量显著多于未经遗传修饰的 MSCs 的数量。这表明表达 CXCR4 的 MSCs 相比于未经遗传修饰的

MSCs 具有改善的存活能力和归集。

CXCR4:SDF-1 轴抗凋亡

对 MSCs 或经 CXCR4 或 SDF-1 转染的 MSCs 进行 AKT 和磷酸化 AKT 的 Western 印迹分析，以确定使 MSCs 表达 CXCR4 或 SDF-1 的遗传修饰对于梗塞心肌内的 MSCs 是否具有抗凋亡效果(即减缓或抑制 MSCs 的凋亡)。图 3 显示经转染以稳定表达 CXCR4 或 SDF-1 的大鼠 MSCs 的 AKT 比未被转染的 MSCs 的 AKT 更易于磷酸化。AKT 的磷酸化已被发现能够抑制 MSCs 的凋亡。

SDF-1 或 CXCR4 的表达对 MSC 归集及存活能力的影响

为评价遗传修饰 MSCs 以表达 CXCR4 是否影响 MSCs 向梗塞心肌的归集以及存活能力，将 MSCs 和经遗传修饰以表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSCs 分别经静脉注入通过 LAD 结扎诱发心肌梗塞后的各只大鼠。

图 4A 所示照片显示了注入对照 MSCs 和表达 SDF-1 和 CXCR4 的 MSCs 3 天后，对应大鼠梗塞区域的代表性切片。

图 4B 比较注射后 3 天梗塞区域单位面积内对照 MSCs 的数量和经遗传修饰以表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSCs 的数量。

如图 4A 和 4B 所示，单位面积内经遗传修饰的 MSCs 的数量显著多于对照 MSCs 的数量。这表明表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSCs 比未经遗传修饰的 MSCs 具有改善的归集及存活能力。

SDF-1 的表达也会降低存活的心肌组织内的凋亡

对以对照 MSCs 和表达 SDF-1 的 MSCs 处理的相应大鼠的梗塞区域进行检查。

图 5 所示为心肌梗塞 4 天后各梗塞区域的照片。照片表明表达 SDF-1 的 MSCs 减缓了存活的心肌组织内的调亡。

表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSC 对缺血性心肌病的作用

为评价遗传修饰 MSCs 以表达 CXCR 是否影响 MSC 向梗塞心肌的归集以及存活能力，将 MSCs 和经遗传修饰以表达 CXCR4 或 SDF-1 的 MSCs 被分别经静脉注入 LAD 结扎诱发心肌梗塞 1 天后的各只大鼠。

图 6 比较了输入盐水、心脏成纤维细胞、对照 MSCs、表达 SDF-1 的 MSCs 以及表达 CXCR4 的 MSCs 的大鼠心肌梗塞 14 天后 LV 功能的改善状况。以缩短分数(shortening fraction)衡量，经表达 SDF-1 或 CXCR4 的 MSCs 处理的梗塞心肌表现出显著增强的 LV 功能。在输入对照 MSCs、心脏成纤维细胞以及盐水的处理方式之间则未观察到缩短分数的显著差异。

从本发明的以上描述，本领域技术人员能预见其改进、变化和修饰。这些在本领域技术内的改进、变化和修饰被所附的权利要求书所涵盖。

<110> 马克·佩恩（Penn, Marc）

<120> 用于治疗性应用的经遗传改变的细胞

<130> CCF-7019

<160> 9

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 352
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val
100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

```
Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
                165                 170                 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn
            180                 185                 190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
        195                 200                 205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser
    210                 215                 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr
225                 230                 235                 240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr
                245                 250                 255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln
            260                 265                 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu
        275                 280                 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe
    290                 295                 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val
305                 310                 315                 320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly
                325                 330                 335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
            340                 345                 350
```

<210> 2
<211> 349
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Met Glu Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Ser Glu Glu Val Gly Ser Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Asp Ser Asn Lys Glu Pro Cys Phe Arg Asp Glu Asn Glu Asn
20 25 30

Phe Asn Arg Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Phe Ile Ile Phe Leu Thr
35 40 45

Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly Tyr Gln Lys
50 55 60

Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu Ser Val Ala
65 70 75 80

Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Asp Ala Met
85 90 95

Ala Asp Trp Tyr Phe Gly Lys Phe Leu Cys Lys Ala Val His Ile Ile
100 105 110

Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala Phe Ile Ser
115 120 125

Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser Gln Ser Ala
130 135 140

Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Ala Val Tyr Val Gly Val Trp Ile Pro
145 150 155 160

Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Ile Ile Phe Ala Asp Val Ser Gln
165 170 175

Gly Asp Gly Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Leu Tyr Pro Asp Ser Leu Trp
180 185 190

Met Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu Ile Leu Pro
195 200 205

```
Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser Lys Leu Ser
    210                 215                 220

His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr Thr Val Ile
225                 230                 235                 240

Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr Val Gly Ile
                245                 250                 255

Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Val Ile Lys Gln Gly Cys Glu
            260                 265                 270

Phe Glu Ser Val Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu Ala Leu Ala
        275                 280                 285

Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ala
    290                 295                 300

Lys Phe Lys Ser Ser Ala Gln His Ala Leu Asn Ser Met Ser Arg Gly
305                 310                 315                 320

Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly His Ser Ser
                325                 330                 335

Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser
            340                 345
```

<210> 3
<211> 1662
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
ccgagggcct gagtgctcca gtagccaccg catctggaga accagcggtt accatggagg     60

ggatcagtat atacacttca gataactaca ccgaggaaat gggctcaggg gactatgact    120

ccatgaagga accctgtttc cgtgaagaaa atgctaattt caataaaatc ttcctgccca    180

ccatctactc catcatcttc ttaactggca ttgtgggcaa tggattggtc atcctggtca    240

tgggttacca gaagaaactg agaagcatga cggacaagta caggctgcac ctgtcagtgg    300

ccgacctcct ctttgtcatc acgcttccct tctgggcagt tgatgccgtg gcaaactggt    360

actttgggaa cttcctatgc aaggcagtcc atgtcatcta cacagtcaac ctctacagca    420

gtgtcctcat cctggccttc atcagtctgg accgctacct ggccatcgtc cacgccacca    480
```

acagtcagag gccaaggaag ctgttggctg aaaaggtggt ctatgttggc gtctggatcc 540

ctgccctcct gctgactatt cccgacttca tctttgccaa cgtcagtgag gcagatgaca 600

gatatatctg tgaccgcttc taccccaatg acttgtgggt ggttgtgttc cagtttcagc 660

acatcatggt tggccttatc ctgcctggta ttgtcatcct gtcctgctat tgcattatca 720

tctccaagct gtcacactcc aagggccacc agaagcgcaa ggccctcaag accacagtca 780

tcctcatcct ggctttcttc gcctgttggc tgccttacta cattgggatc agcatcgact 840

ccttcatcct cctggaaatc atcaagcaag ggtgtgagtt tgagaacact gtgcacaagt 900

ggatttccat caccgaggcc ctagctttct tccactgttg tctgaacccc atcctctatg 960

ctttccttgg agccaaattt aaaacctctg cccagcacgc actcacctct gtgagcagag 1020

ggtccagcct caagatcctc tccaaaggaa agcgaggtgg acattcatct gtttccactg 1080

agtctgagtc ttcaagtttt cactccagct aacacagatg taaaagactt ttttttatac 1140

gataaataac tttttttaa gttacacatt tttcagatat aaaagactga ccaatattgt 1200

acagttttta ttgcttgttg gatttttgtc ttgtgtttct ttagtttttg tgaagtttaa 1260

ttgacttatt tatataaatt ttttttgttt catattgatg tgtgtctagg caggacctgt 1320

ggccaagttc ttagttgctg tatgtctcgt ggtaggactg tagaaaaggg aactgaacat 1380

tccagagcgt gtagtgaatc acgtaaagct agaaatgatc cccagctgtt tatgcataga 1440

taatctctcc attcccgtgg aacgtttttc ctgttcttaa gacgtgattt tgctgtagaa 1500

gatggcactt ataaccaaag cccaaagtgg tatagaaatg ctggtttttc agttttcagg 1560

agtgggttga tttcagcacc tacagtgtac agtcttgtat taagttgtta ataaaagtac 1620

atgttaaact taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1662

<210> 4
<211> 1050
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 4
atggaaatat acacttcgga taactactcc gaagaagtag ggtctggaga ctatgactcc 60

aacaaggaac cctgcttccg ggatgaaaac gaaaacttca acaggatctt cctgcccacc 120

atctatttta tcatcttctt gactggcata gtgggcaatg ggttggtaat cctggtcatg 180

ggttaccaga agaagctgag gagcatgaca gacaagtacc ggctgcacct gtccgtggct 240

gacctcctct ttgtcatcac actccccttc tgggcagtgg acgccatggc tgactggtac 300

tttgggaaat ttttatgtaa ggctgtgcat atcatctaca ccgtcaacct ttacagcagt 360

gttctcatcc tggccttcat cagcctggac cgctaccttg ccattgtcca cgccaccaac 420

agccagagcg cgaggaagct gctggctgaa aaggccgtct atgtgggtgt ctggatcccc 480

gccctcctcc tgactatccc tgacatcatc ttcgccgatg tcagccaggg ggacggcagg 540

tacatctgtg accgccttta ccccgacagc ctgtggatgg tggtgttcca gttccagcac 600

atcatggtgg gtctcatcct gccgggcatc gtcatcctgt cctgttactg catcatcatc 660

tccaagctgt cacactccaa gggccaccag aagcgcaagg ccctcaagac tacggtcatc 720

cttatcctgg ctttctttgc ctgctggcta ccgtattacg tggggatcag catcgattcc 780

ttcatccttt tggaggtcat caagcaagga tgtgagttcg agagcgtcgt gcacaagtgg 840

atctccatca cggaggccct cgccttcttc cactgttgcc tgaaccccat cctctacgcc 900

ttcctcgggg ccaaattcaa gagctccgcg cagcatgcac tcaattccat gagcagaggc 960

tccagcctca agatcctttc caaagggaaa cggggtggac actcttccgt ctccacagag 1020

tcagaatcct caagttttca ctccagctaa 1050

<210> 5
<211> 68
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Lys Pro Val Ser Leu Leu Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 6
<211> 89
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 7
<211> 89
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Asp Ala Lys Val Val Ala Val Leu Ala Leu Val Leu Ala Ala Leu
1 5 10 15

Cys Ile Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys
20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys
35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys
50 55 60

Ser Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln
65 70 75 80

Glu Tyr Leu Asp Lys Ala Leu Asn Lys
85

<210> 8
<211> 1940
<212> RNA
<213> Homo sapiens

<400> 8
gccgcacttt cactctccgt cagccgcatt gcccgctcgg cgtccggccc ccgacccgcg 60

ctcgtccgcc cgcccgcccg cccgcccgcg ccatgaacgc caaggtcgtg gtcgtgctgg 120

tcctcgtgct gaccgcgctc tgcctcagcg acgggaagcc cgtcagcctg agctacagat 180

gcccatgccg attcttcgaa agccatgttg ccagagccaa cgtcaagcat ctcaaaattc 240

tcaacactcc aaactgtgcc cttcagattg tagcccggct gaagaacaac aacagacaag 300

tgtgcattga cccgaagcta aagtggattc aggagtacct ggagaaagct ttaaacaagt 360

aagcacaaca gccaaaaagg actttccgct agacccactc gaggaaaact aaaaccttgt 420

gagagatgaa agggcaaaga cgtgggggag ggggccttaa ccatgaggac caggtgtgtg 480

tgtggggtgg gcacattgat ctgggatcgg gcctgaggtt tgccagcatt tagaccctgc 540

atttatagca tacggtatga tattgcagct tatattcatc catgccctgt acctgtgcac 600

gttggaactt ttattactgg ggtttttcta agaaagaaat tgtattatca acagcatttt 660

caagcagtta gttccttcat gatcatcaca atcatcatca ttctcattct catttttaa 720

atcaacgagt acttcaagat ctgaatttgg cttgtttgga gcatctcctc tgctcccctg 780

gggagtctgg gcacagtcag gtggtggctt aacagggagc tggaaaaagt gtcctttctt 840

cagacactga ggctcccgca gcagcgcccc tcccaagagg aaggcctctg tggcactcag 900

ataccgactg gggctgggcg ccgccactgc cttcacctcc tctttcaacc tcagtgattg 960

gctctgtggg ctccatgtag aagccactat tactgggact gtgctcagag acccctctcc 1020

cagctattcc tactctctcc ccgactccga gagcatgctt aatcttgctt ctgcttctca 1080

tttctgtagc ctgatcagcg ccgcaccagc cgggaagagg gtgattgctg gggctcgtgc 1140

cctgcatccc tctcctccca gggcctgccc cacagctcgg gccctctgtg agatccgtct 1200

ttggcctcct ccagaatgga gctggccctc tcctggggat gtgtaatggt ccccctgctt 1260

acccgcaaaa gacaagtctt tacagaatca aatgcaattt taaatctgag agctcgcttt 1320

gagtgactgg gttttgtgat tgcctctgaa gcctatgtat gccatggagg cactaacaaa 1380

ctctgaggtt tccgaaatca gaagcgaaaa aatcagtgaa taaaccatca tcttgccact 1440

acccccctcct gaagccacag cagggtttca ggttccaatc agaactgttg gcaaggtgac 1500

atttccatgc ataaatgcga tccacagaag gtcctggtgg tatttgtaac tttttgcaag 1560

gcatttttt atatatattt ttgtgcacat tttttttac gtttctttag aaaacaaatg 1620

tatttcaaaa tatatttata gtcgaacaat tcatatattt gaagtggagc catatgaatg 1680

tcagtagttt atacttctct attatctcaa actactggca atttgtaaag aaatatatat 1740

gatatataaa tgtgattgca gcttttcaat gttagccaca gtgtattttt tcacttgtac 1800

taaaattgta tcaaatgtga cattatatgc actagcaata aaatgctaat tgtttcatgg 1860

tataaacgtc ctactgtatg tgggaattta tttacctgaa ataaaattca ttagttgtta 1920

gtgatggagc ttaaaaaaaa 1940

<210> 9
<211> 293
<212> RNA
<213> Rattus norvegicus

<400> 9
ccatggacgc caaggtcgtc gctgtgctgg ccctggtgct ggccgcgctc tgcatcagtg 60

acggtaagcc agtcagcctg agctacagat gcccctgccg attctttgag agccatgtcg 120

ccagagccaa cgtcaaacat ctgaaaatcc tcaacactcc aaactgtgcc cttcagattg 180

ttgcaaggct gaaaagcaac aacagacaag tgtgcattga cccgaaatta aagtggatcc 240

aagagtacct ggacaaagcc ttaaacaagt aagcacaaca gcccaaagga ctt 293

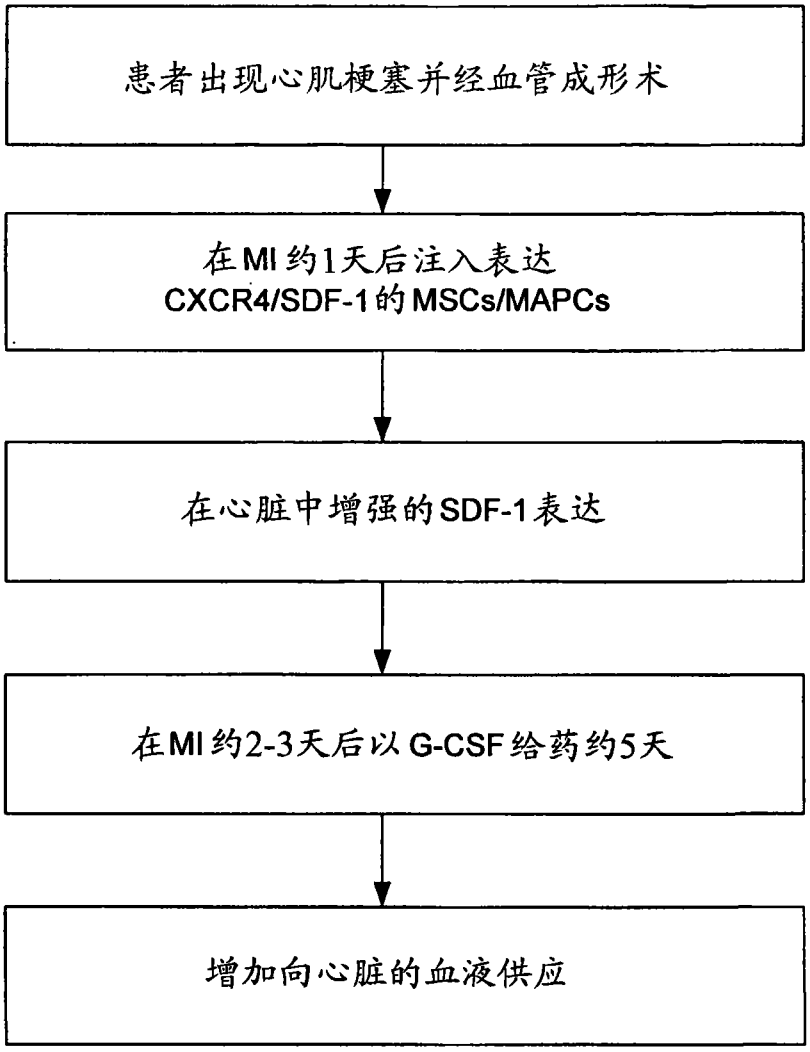

患者出现心肌梗塞并经血管成形术
在MI约1天后注入表达
CXCR4/SDF-1的MSCs/MAPCs
在心脏中增强的SDF-1表达
在MI约2-3天后以G-CSF给药约5天
增加向心脏的血液供应

图 1

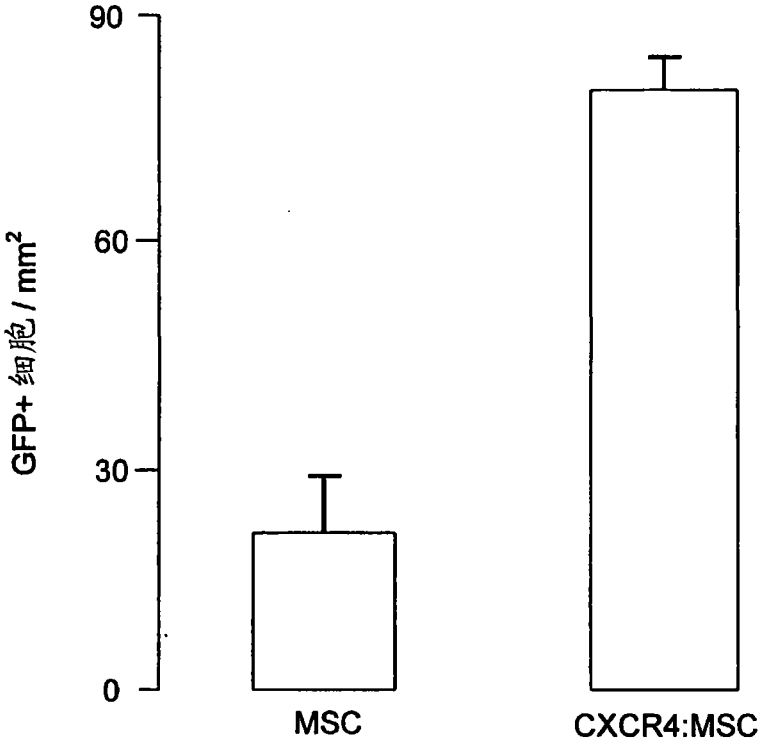

90
60
30
0
GFP+ 细胞 / mm²
MSC
CXCR4:MSC

图 2

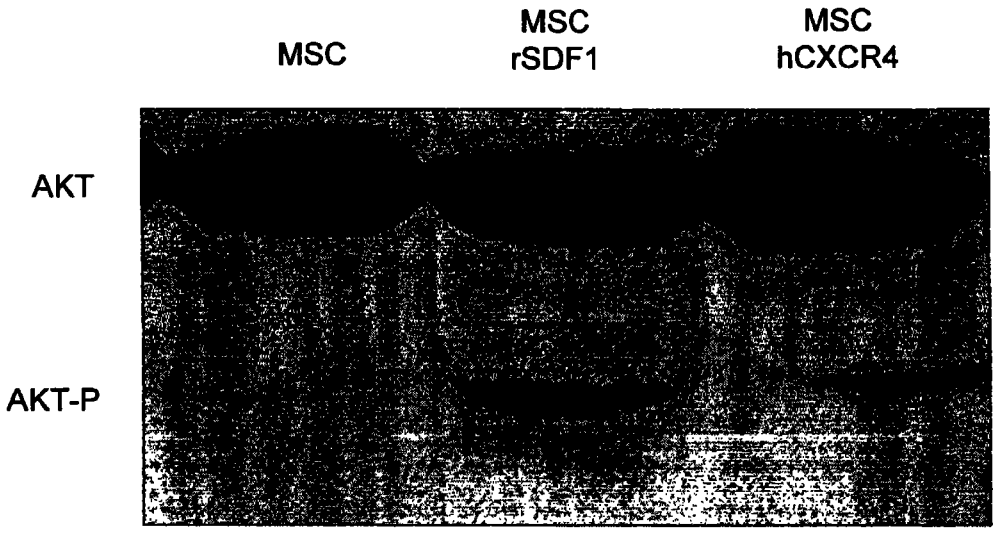

MSC
MSC
rSDF1
MSC
hCXCR4
AKT
AKT-P

图 3

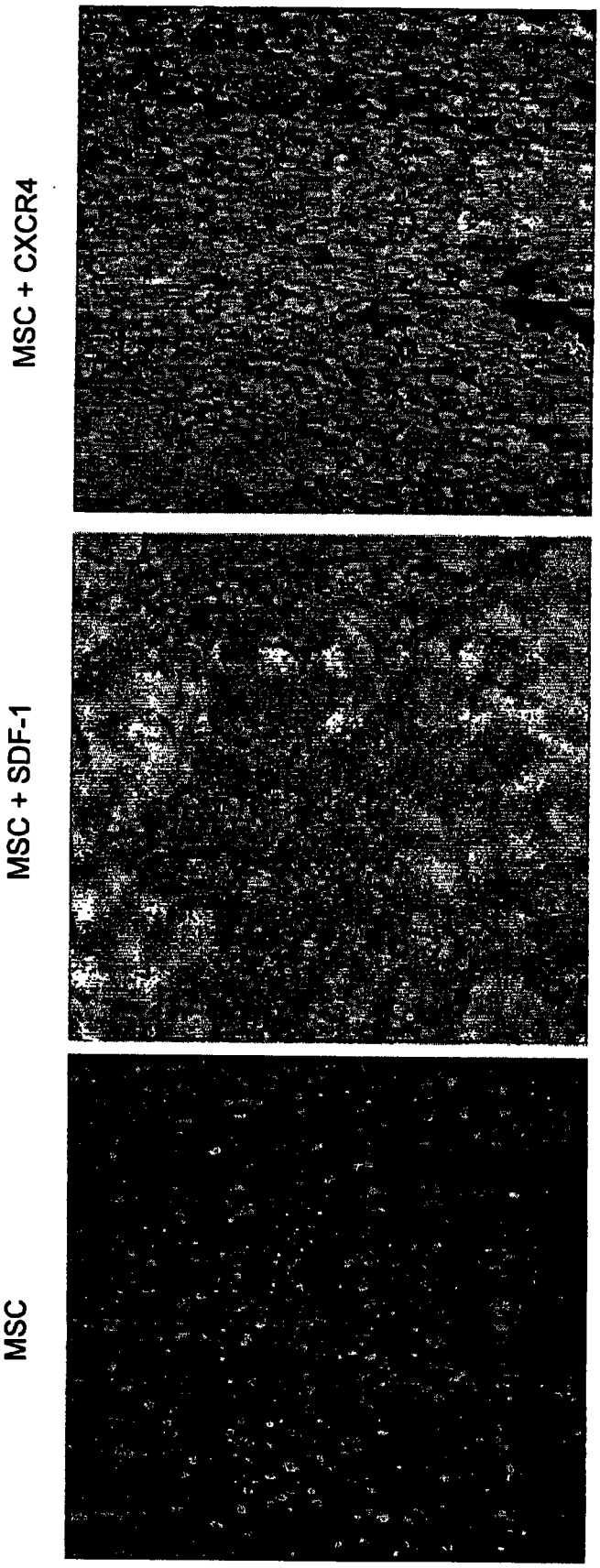


图 4A

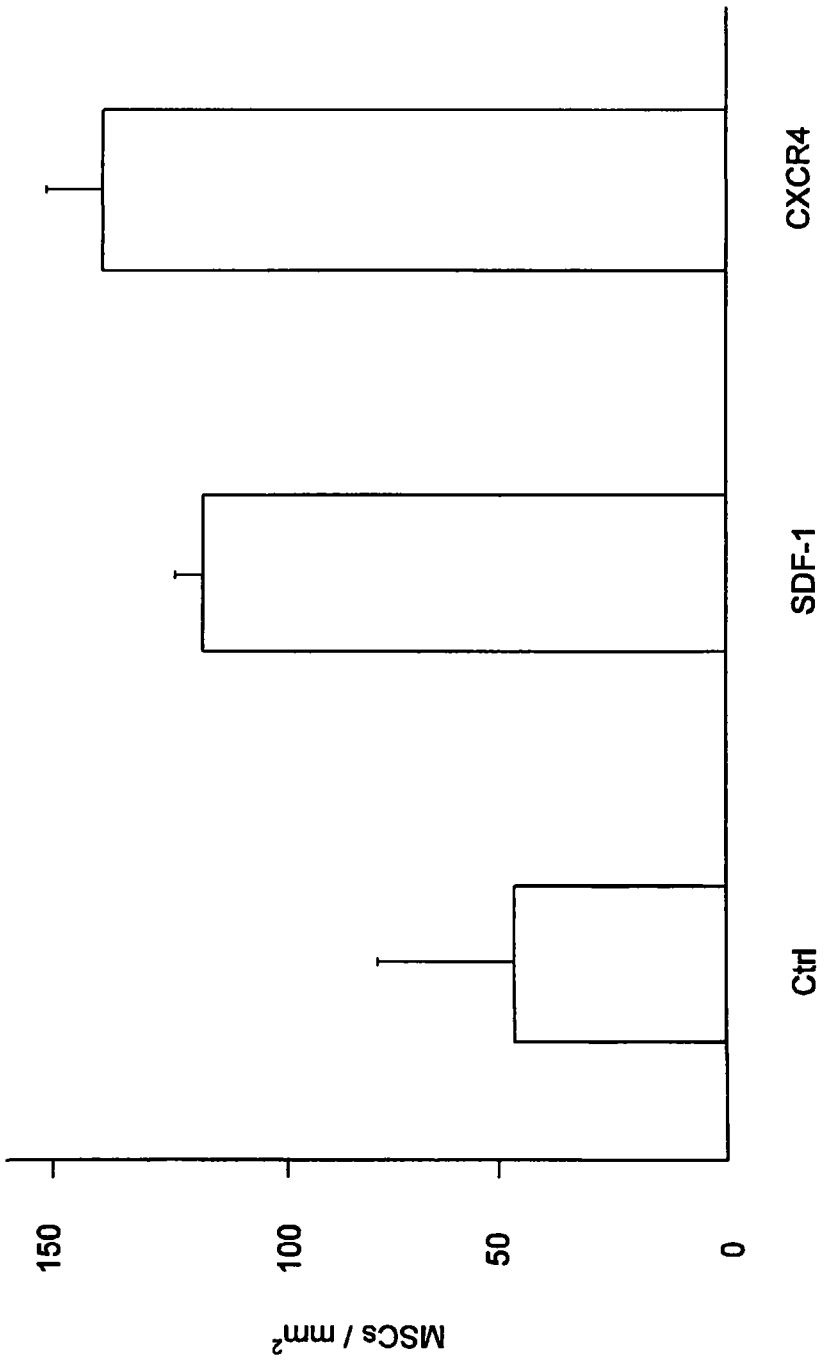


图 4B

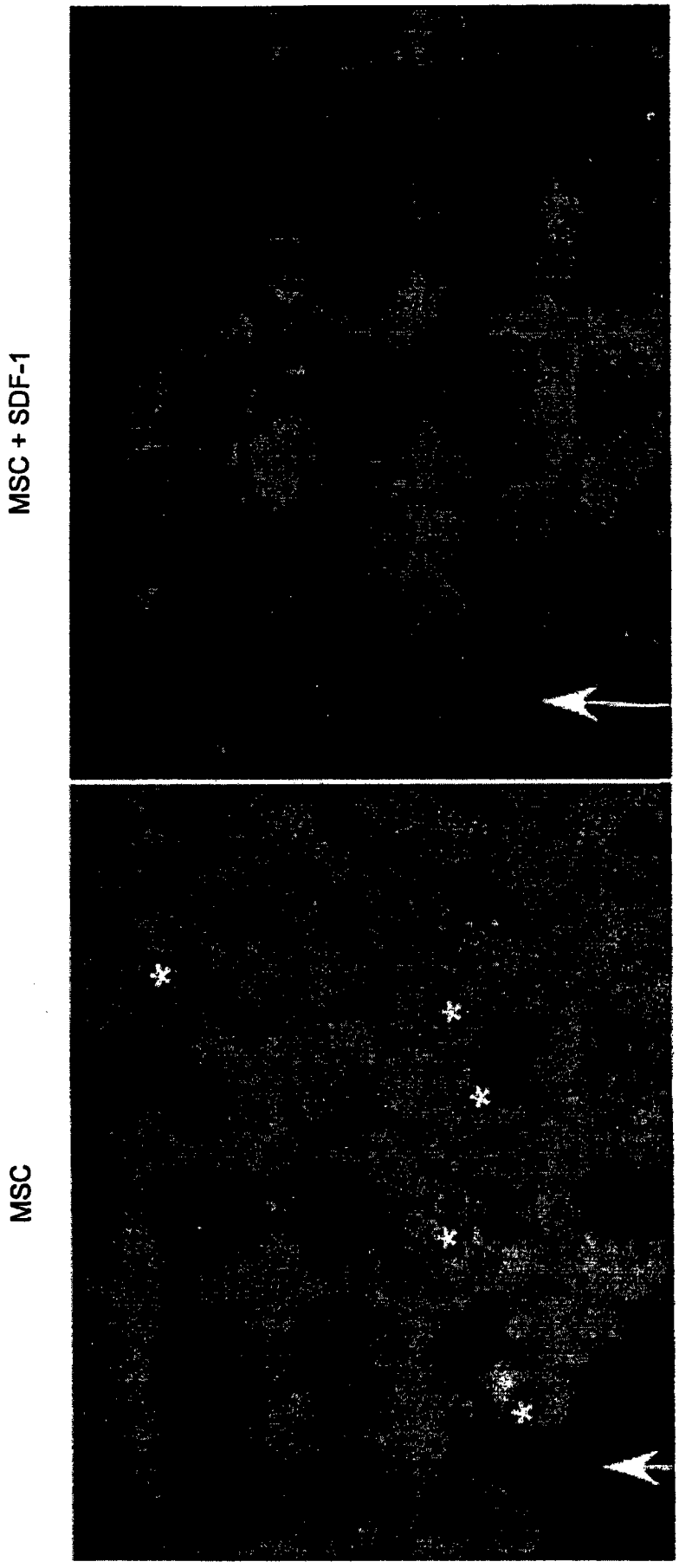


图 5

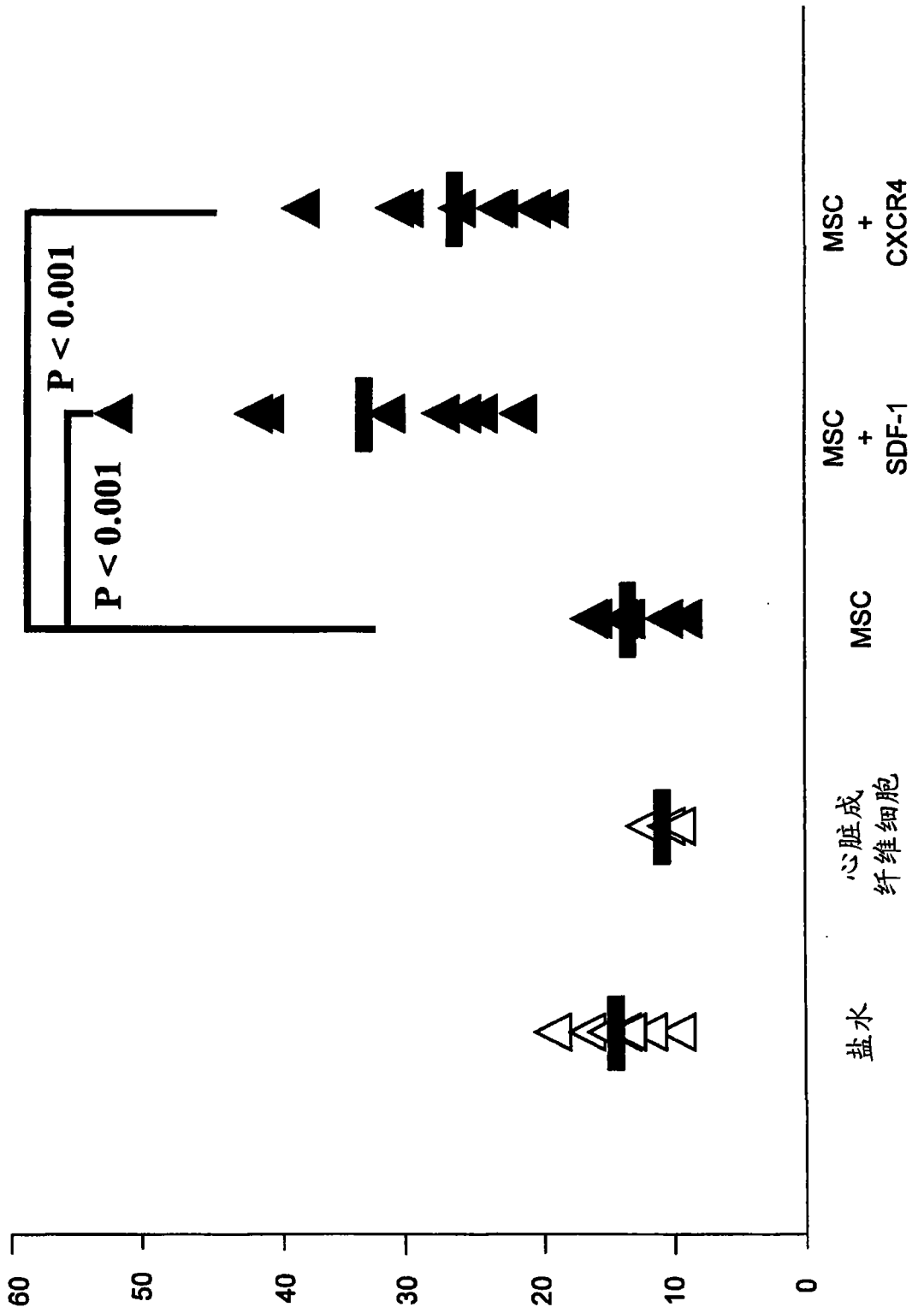

60
50
40
30
20
10
0
P < 0.001
P < 0.001
盐水
心脏成纤维细胞
MSC
MSC + SDF-1
MSC + CXCR4

图 6